

Die zeitliche Stabilität und zelluläre Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen wird durch die Rezeptorphosphorylierung determiniert

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr.rer.nat.

vorgelegt am Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

von

Diana Zindel

aus Eschwege

Marburg an der Lahn

2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Carsten Culmsee

Eingereicht am: 09.06.2015

Tag der mündlichen Prüfung am: 21.07.2015

Hochschulkennziffer: 1180

1.Betreuer : Dr. Cornelius Krasel

2.Betreuer: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

1	Einleitung	1
1.1	Rezeptoren	1
1.1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.2	Grundstruktur	2
1.1.3	G-Protein-vermittelte Signaltransduktion	2
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)	4
1.3	β -adrenerge Rezeptoren	5
1.3.1	Struktur des β 2-adrenergen Rezeptors im inaktiven und aktiven Zustand	5
1.3.2	Funktionelle Konsequenzen der β 2AR-Aktivierung	7
1.3.2.1	β 2AR Kopplung an G-Proteine	7
1.3.2.2	β 2AR-Phosphorylierung und ligandenspezifische Signaltransduktion	8
1.3.2.3	Rezeptordimerisierung	10
1.4	PTH-Rezeptoren	10
1.4.1	Ligandenbindung und physiologische Funktionen	10
1.4.2	PTH1R-vermittelte Signalwege	12
1.4.3	PTH1R-Phosphorylierung und Arrestin-vermittelte Signalwege	13
1.5	Arrestin	14
1.5.1	Arrestin-Struktur und Rezeptorinteraktion	14
1.5.2	Arrestin beeinflusst die Desensibilisierung und Internalisierung von Rezeptoren	16
1.5.3	Arrestin-posttranslationale Modifikationen	17
1.5.4	Arrestin-Interaktionspartner	19
1.5.5	Arrestin-Physiologie und- Pathophysiologie	21
1.5.5.1	Die Rolle von Arrestin in der Entwicklung	21
1.5.5.2	Die Rolle von Arrestin in der kardiovaskulären Signaltransduktion	21
1.5.5.3	Die Rolle von Arrestin in Tumoren	22
1.5.5.4	Die Rolle von GPCR und Arrestin bei der Alzheimer Erkrankung	23
1.6	Biophysikalische Messmethoden	23
1.6.1	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	23
1.6.1.1	FRET in experimenteller Anwendung	25
1.6.2	FRAP	27
1.7	Analyse der posttranslationalen Phosphorylierung	28
1.7.1	RIPA	29
1.7.2	2D-Phosphopeptidmapping	30
1.7.3	Phosphospezifische Antikörper	30
1.7.4	Phosphoproteomik	30
1.7.4.1	Lokalisation von Phosphorylierungsstellen durch massenspektrometrische Fragmentationenanalyse	31

Zielsetzung.....	33
2 Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	35
2.1.2 Plasmide	37
2.1.3 Eukaryotische und prokaryotische Zelllinien.....	39
2.1.4 Primer.....	40
2.1.4.1 Primer zur zielgerichteten Mutagenese	40
2.1.5 Antikörper	42
2.1.5.1 Primäre Antikörper.....	42
2.1.5.2 Sekundäre Antikörper.....	42
2.1.6 Liganden.....	43
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Kultivierung von Zellen	43
2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	43
2.2.1.2 Kultivierung von Zellen.....	44
2.2.1.3 Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene®.....	44
2.2.1.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	45
2.2.1.5 Passagieren von Zellen auf Deckgläschen.....	45
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.2.1 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion.....	45
2.2.2.2 Mutagenese	47
2.2.2.3 Restriktionsverdau.....	47
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.2.5 DNA- Extraktion aus Agarosegelen.....	49
2.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	49
2.2.2.7 Kompetente E. coli.....	50
2.2.2.8 Transformation in kompetente E.coli	50
2.2.2.9 Herstellung LB-Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin.....	51
2.2.2.10 Mini-Präparation	51
2.2.2.11 Midi-Präparation	52
2.2.2.12 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	52
2.2.2.13 Sequenzierung.....	52
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	53
2.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	53
2.2.3.2 Western-Blot.....	54
2.2.3.3 Immunochemische Detektion	55
2.2.3.4 Bestimmung der totalen Rezeptorphosphorylierung durch metabolische Markierung mit [³² P].....	56
2.2.3.5 Membranpräparationen.....	58
2.2.3.6 Radioligandenbindung.....	58
2.2.3.7 Internalisierung- und Recycling von β2-adrenergen Rezeptoren	59

2.2.3.8	Rezeptorreinigung und Massenspektrometrie	60
2.2.4	Biophysikalische Methoden	61
2.2.4.1	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	61
2.2.4.2	Fluorescence recovery after Photobleaching (FRAP)	66
2.2.4.3	Konfokalmikroskopie	69
2.2.5	Statistik und Software	70
3	Ergebnisse	72
3.1	Die zielgerichtete Hyperphosphorylierung des β 2-adrenergen Rezeptors verlängert die Interaktion mit Arrestin-3 und induziert dessen Internalisierung	72
3.1.1	Expression β 2-adrenerger Rezeptoren	73
3.1.2	Agonist-induzierte β 2-Rezeptorphosphorylierung	74
3.1.3	β 2-Rezeptorinteraktion mit G_s -Proteinen	77
3.1.4	β 2-Rezeptorphosphorylierung und -interaktion mit Arrestin	79
3.1.5	Arrestin-3- β 2-Rezeptorinteraktion nach Adrenalinstimulation und anschließender Isoprenalinstimulation	81
3.1.6	Interaktion von visuellem Arrestin mit verschiedenen Varianten des β 2-adrenergen Rezeptors	83
3.1.7	Bestimmung der Arrestin-3-Affinität in Abwesenheit überexprimierter GRK2	84
3.1.8	Ausmaß der GRK 2 Überexpression	85
3.1.9	Die Rezeptorphosphorylierung determiniert das Ausmaß der Arrestininteraktion	86
3.1.10	Einfluss eines distalen SSS-Clusters auf die Arrestin-Affinität	88
3.1.11	Arrestin-Rezeptor-Interaktion in kontinuierlicher Gegenwart eines Agonisten	89
3.1.12	Die Rezeptorphosphorylierung determiniert den zellulären Arrestin-3 Transport	92
3.1.13	Agonist-induzierte Rezeptorinternalisierung und Recycling nach Entfernen des Agonists	96
3.1.14	Nachgeschaltete Signalwege	97
3.2	Identifikation ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen im humanen PTHR1 und Untersuchung von deren funktioneller Relevanz	101
3.2.1	Phosphoproteomanalyse des humanen PTHR1	101
3.2.2	Das Ausmaß der C-terminalen PTHR-Phosphorylierung unterscheidet sich abschnittspezifisch	107
3.2.3	Analyse der funktionellen Bedeutung von Phosphorylierungsstellen im PTHR	110
3.2.4	Proximale Serine und Threonine im PTHR determinieren die Arrestin-3-Rekrutierung	114
3.2.5	Die Phosphorylierungen zwischen S501 und T506 erhöhen die Affinität von Arrestin-3 zum PTHR	115
3.2.6	Untersuchung der agonistabhängigen Arrestin-3 Kointernalisierung mit dem PTHR	119
3.2.7	Vergleich des vollen Agonisten hPTH 1-34 mit dem Liganden D-Trp ¹² , Tyr ³⁴ bPTH 7-34	124

3.3	Das Einfügen zweier konservativer Mutationen im β -Faltblatt 1 in Arrestin-3 beeinflusst die Affinität zu verschiedenen Rezeptormutanten in unterschiedlicher Weise.	126
3.3.1	Die Dissoziationsrate von Arrestin-3 K11, 12 R von verschiedenen β 2-adrenergen Rezeptormutanten ist verglichen mit der Dissoziationsrate von Arrestin-3 beschleunigt.	126
3.3.2	Vergleich der Affinität von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R zum PTHR und zum β 2V2-Rezeptor	129
3.3.2.1	Zellulärer Transport von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R mit verschiedenen Rezeptormutanten	132
3.4	Ergebnisanhang	136
4	Diskussion	138
4.1	Funktionelle Konsequenzen von zusätzlichen Phosphorylierungsstellen im β 2-adrenergen Rezeptor	138
4.2	Identifikation und Quantifizierung ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen im PTHR	145
4.2.1	Funktionelle Bedeutung proximaler Phosphorylierungsstellen im PTHR.	148
4.3	Die Rolle positiv geladener Aminosäuren als Phosphaterkennungssensoren im β -Faltblatt 1 in Arrestin-3.	150
4.4	Perspektiven	155
	Zusammenfassung	156
	Summary	158
	Abbildungsverzeichnis	160
	Tabellenverzeichnis	163
	Literaturverzeichnis	164
	Publikationen	183
	Lebenslauf	184
	Erklärung	185
	Danksagungen	186

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid-beta
ANOVA	„analysis of variance“
AP-2	Adaptin 2-Komplex
Arr	Arrestin
vArr	visuelles Arrestin
ARF6	ADP-Ribosylierungsfaktor 6
Ask-1	„apoptosis signal-regulating“
AT1R	Angiotensin-1-Rezeptor
β 2AR	β 2-adrenerger Rezeptor
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer
c-Src	„cellular sarcoma“, Tyrosinkinase
c-Raf	„rapidly accelerated fibrosarcoma“
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca SR	Calcium-sensing-receptor
Cer	Cerulean
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
D ₃ R	Dopamin D ₃ Rezeptor
DAG	Diacylglycerol
DGK	Diacylglycerolkinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximal effektive Konzentration
ECL	extrazelluläre Schleife
E. coli	Escherichia coli
EEA1	„early endosome antigen“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
ESI	Elektrosprayionisation
F	Fluoreszenzintensität
FLIM	„fluorescence lifetime imaging microscopy“
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FRAP	„fluorescence recovery after photobleaching“
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GDP	Guanidinphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
Hh	Hedgehog
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen

IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	Januskinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LHR	Rezeptor für luteinisierendes Hormon
M ₃ AchR	muskarinerges Acetylcholinrezeptor
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
Nb	Nanobody
NHERF	„Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor“
p-Akt	Phospho-Akt (phosphorylierte Proteinkinase B)
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PLC	Phospholipase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE4	Phosphodiesterase 4
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTHr	Parathyroidhormonrezeptor
PTH-rp	„parathyroid-hormone-related peptide“
RANKL	„receptor activator of NF-κB Ligand“
RhoA	„Ras homolog gene family member A“
RIPA	Radioimmunpräzitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	„region of interest“
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
S.E.M.	Standardfehler
sm-FRET	single molecule fluorescence resonance energy transfer
t _{0,5}	Halbwertszeit
TIP 39	tuberoinfundibuläres Peptid 39
TM	Transmembrandomäne
V2R	Vasopressin-Typ2-Rezeptor
VLK	„vertebrate lonesome kinase“
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Rezeptoren

Um von außen kommende Informationen ins Zellinnere übermitteln zu können, sind Rezeptorproteine in die Zellmembran eingelagert, die als Reaktion auf die Bindung mit einem spezifischen Liganden ihre Form verändern oder Aggregate bilden können. In eukaryotischen Zellen existieren verschiedene plasmamembranständige Rezeptoren, welche die Signalübertragung im Zellinneren einleiten. Die Unterteilung erfolgt in Ionenkanalrezeptoren, Tyrosinkinasen und in G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Darüber hinaus gibt es intrazelluläre Rezeptoren wie Steroid- oder Schilddrüsenhormonrezeptoren.

1.1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind heptahelikale Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (7TM). Durch Interaktion mit extrazellulären Liganden und intrazellulären G-Proteinen vermitteln GPCR die Einleitung von Signalkaskaden und ermöglichen Zellen die Antwort und die nachfolgende Anpassung an externe Stimuli. Es existiert eine Vielzahl an Liganden, die von GPCR erkannt werden. Dazu zählen Amine, Lipide, Eikosanoide, Nukleotide, Neuropeptide, aber auch Hormone und sogar einzelne Photonen können die Aktivierung eines GPCRs auslösen (Lagerström und Schiöth, 2008). Mit über 1000 Vertretern, die von etwa 3 % des menschlichen Genoms kodiert werden, repräsentieren GPCR die größte Familie der in die Signaltransduktion involvierten Membranproteine (Fredriksson *et al.*, 2003; Ritter und Hall, 2009). Die immense Bedeutung für die interzelluläre Signaltransduktion macht GPCR zu wichtigen pharmakologischen Zielstrukturen und hat zur Entwicklung zahlreicher Arzneistoffe geführt (Ma und Zimmel, 2002). Die Einteilung der GPCR erfolgt in 5 bzw. 6 Klassen (Fredriksson *et al.*, 2003), die meisten Vertreter finden sich in Klasse A (rhodopsinartig), Klasse B (sekretinartig) und C (metabotrop-glutamartig). Weitere, noch weniger erforschte Klassen von GPCR sind Adhäsions-GPCRs und sogenannte Frizzled/Taste-GPCR.

1.1.2 Grundstruktur

Trotz ihrer Vielfalt weisen GPCR evolutionär hochkonservierte Strukturmerkmale auf. Sieben hydrophobe Domänen, die durch je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Domänen verbunden sind, durchspannen die Plasmamembran alternierend in Form von α -Helices. Die Bindung des Liganden erfolgt an Transmembrandomänen oder am N-Terminus (Strader *et al.*, 1995) (**Abbildung 1.1**). Die Weiterleitung eines Signals nach erfolgter Ligandenbindung wird durch die Kopplung von G-Proteinen an die dritte zytoplasmatische Schleife vermittelt (Gether, 2000). Der C-Terminus oder die dritte zytoplasmatische Schleife ist durch Interaktion mit Arrestinen und G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) an der Signalabschaltung beteiligt.

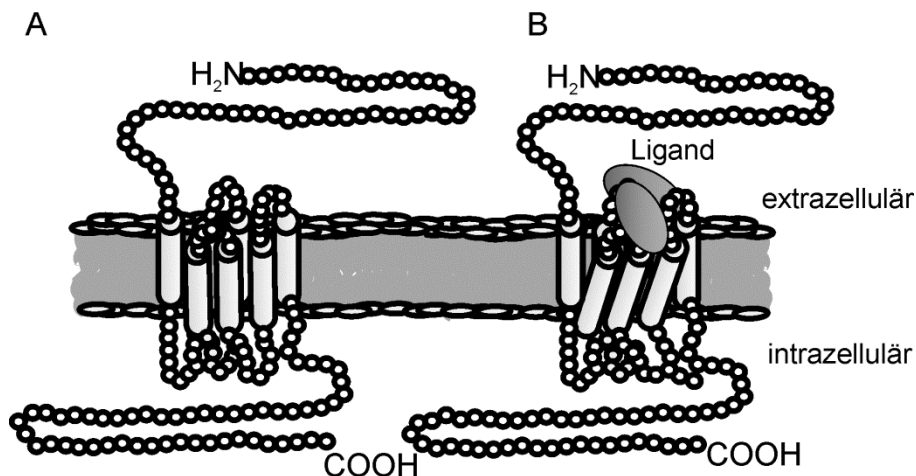


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur eines GPCR im inaktiven und aktiven Zustand A) Die Grundstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors besteht aus sieben transmembranären α -Helices, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der Aminotерminus ragt in den Extrazellulärraum, der Carboxyterminus ragt in den Intrazellulärraum. B) Nach Ligandenbindung durchläuft der Rezeptor eine Konformationsänderung und am C-Terminus findet die Interaktion mit G-Proteinen und Arrestinen statt, die wichtige Aufgaben der Signaltransduktion erfüllen.

1.1.3 G-Protein-vermittelte Signaltransduktion

Die Stimulation mit einem Agonisten verursacht eine Konformationsänderung des GPCR und führt zur Interaktion mit membrangebundenen, heterotrimeren G-Proteinen. Diese durchlaufen selbst eine Konformationsänderung, binden an den Rezeptor und werden dadurch aktiviert. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α -Untereinheit, die GDP und GTP binden kann, und aus einer als konstitutives Dimer vorliegenden $\beta\gamma$ -Untereinheit (Gilman, 1987). Die Spezifität der G-Protein-Interaktion mit GPCR wird vorwiegend durch den C-Terminus der G-Protein- α -Untereinheit vermittelt (Conklin *et al.*, 1993).

Darüber hinaus sind aber auch N-terminale Elemente (Kostenis *et al.*, 1997) sowie α -helikale Bereiche der $G\alpha$ -Untereinheit bei der Interaktion mit GPCR involviert (Lee *et al.*, 1995). Bei der durch Rezeptorstimulation ausgelösten Aktivierung von G-Proteinen wird der Austausch von GDP gegen GTP begünstigt, was zur konformationellen Umlagerung des heterotrimeren G-Proteinkomplexes (Clapham und Neer, 1993; Bünemann *et al.*, 2003) oder zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit vom $G\beta\gamma$ -Komplex führt (Gilman, 1987). Durch direkte Interaktion mit intrazellulären Signalproteinen lösen $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ verschiedene zelluläre Antworten aus (Milligan und Kostenis, 2006). Die Inaktivierung der G-Proteine erfolgt durch die endogene GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, die GTP zu GDP spaltet. $G\alpha$ -GDP kann sich nun mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammenlagern und steht für einen erneuten Ablauf des G-Protein Zyklus zu Verfügung.

Im Menschen kommen 21 verschiedene $G\alpha$ -Proteine vor, die durch 16 verschiedene Gene codiert werden (Downes und Gautam, 1999). Gewöhnlich werden die heterotrimeren G-Proteine in 4 Gruppen nach der Sequenz der $G\alpha$ Untereinheit eingeteilt: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q/11}$ und $G_{\alpha 12}$ (Moreira, 2014). Die Aktivierung von $G_{\alpha s}$ -Untereinheiten führt zur direkten Stimulation von Adenylylcyclasen und dadurch zur Bildung von cAMP (Simon *et al.*, 1991). cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche wiederum sub- und zelltypspezifisch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR und damit die myogene Kopplung fördert. Umgekehrt kann die myogene Kopplung auch durch die direkte, PKA-vermittelte Inhibition der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) gedrosselt werden (Raina *et al.*, 2009). Die Aktivierung von $G_{\alpha i}$ führt zur Hemmung von Adenylylzyklasen und damit zur Senkung der cAMP-Konzentration in Zellen (Simon *et al.*, 1991). Dies führt z.B. vermittelt durch α_{2A} -Rezeptoren in präsynaptischen Zellen zum verminderten Ca^{2+} -Einstrom und verstärkten K^+ -Einstrom und damit zur Hyperpolarisation. Durch die verringerte Ca^{2+} -Konzentration in präsynaptischen Zellen wird z.B. die Noradrenalinfreisetzung gedrosselt, dies ist ein Phänomen, welches auch als autoinhibitorischer negativer Rückkopplungsmechanismus bezeichnet wird. Eine wichtige Funktion von $G_{\alpha q/11}$ besteht in der Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (Taylor *et al.*, 1991), welche Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Organellen wie das endoplasmatische oder das sarkoplasmatische Retikulum verfügen über IP_3 -Rezeptorkanäle und können z.B. infolge einer $\alpha 1R$ -vermittelten $G_{\alpha q}$ -Aktivierung Ca^{2+} freisetzen und die myogene Kontraktion bewirken. DAG wiederum kann die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C aktivieren (Berridge, 2009). Die Aktivierung der Proteinkinase $C\zeta$ führt z.B. in vaskulären Glattmuskelzellen zur Angiotensin II

vermittelten ERK1/2-Aktivierung, wodurch Zellteilung und- differenzierung reguliert werden (Liao *et al.*, 1997).

Die beschriebenen Signalkaskaden können der kanonischen Signaltransduktion zugeordnet werden. Lange Zeit ging man davon aus, dass G-Proteinsignalkaskaden hauptsächlich an der Plasmamembran ausgelöst und ebendort, unterstützt durch die GRK- und Arrestin-abhängige Desensitierung, beendet werden (Luttrell und Lefkowitz, 2002). Neuere Studien scheinen jedoch einen Paradigmenwechsel einzuleiten. Kürzlich wurde am β_2 -adrenergen Rezeptor gezeigt, dass G-Proteinsignalkaskaden auch nach der Rezeptorinternalisierung von Endosomen ausgehen können (Irannejad *et al.*, 2013). Zuvor konnte bereits in Hefen gezeigt werden, dass die G-Protein- α -Untereinheit Gpa1 in Endosomen- oder Vakuolenmembranen lokalisiert ist und von dort aus Signalkaskaden in Gang setzen kann (Slessareva *et al.*, 2006). Dass weitere intrazelluläre Organelle in die G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung involviert sein können, zeigen jüngste Studien an Kardiomyozyten (Malik *et al.*, 2015). Hier wurde demonstriert, dass die Translokation von G $\beta\gamma$ zum Golgi-Apparat zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4-phosphat (PI4P) durch PLC ϵ führt und kardiale Hypertrophie hervorrufen kann. G-Proteine sind nicht nur in Säugerzellen sondern auch in Pflanzenzellen zu finden. Pflanzen exprimieren allerdings keine GPCR, stattdessen findet die Autoaktivierung der G-Proteine statt. Die Regulation findet durch die Terminierung des G-Protein-Signals statt (Urano und Jones, 2014).

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)

Im Menschen gibt es sieben verschiedene GRK, GRK 1-7 (Pitcher *et al.*, 1998). GRK 1 und GRK 7 sind in der Retina lokalisiert. GRK2 und GRK3 werden ubiquitär im Cytosol exprimiert und weisen beide eine C-terminale PH-Domäne auf. Diese Domäne vermittelt durch PIP₂ und die G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Translokation dieser beiden Kinasen an aktivierte Rezeptoren. GRK 4,5, und 6 fehlen die $\beta\gamma$ -Bindungsdomänen, die permanente Membranlokalisation wird durch direkte Phospholipid 2 Bindung oder die kovalente Modifikation mit Palmitat vermittelt. GRK 5 und 6 werden ebenfalls ubiquitär exprimiert, während GRK4 hauptsächlich in den Testes zu finden ist (Gainetdinov *et al.*, 2000). GRK phosphorylieren aktivierte GPCR und tragen so zu homologen Desensibilisierung bei (siehe auch 1.5.2). Im Gegensatz zur Rezeptorphosphorylierung durch PKA führt die Rezeptorphosphorylierung durch GRK zur Rekrutierung von Arrestin und zur Internalisierung von Rezeptoren (Lohse, 1993). GRK phosphorylieren hauptsächlich

Serine und Threonine im C-Terminus oder in der dritten intrazellulären Schleife in der Nähe saurer Aminosäuren des GPCR. Ob GRK dabei subtypspezifisch bestimmte Serine oder Threonine in Rezeptoren phosphorylieren können oder eher unselektiv sind, ist Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Es gibt Hinweise, dass Serin 355, 356 am β 2AR spezifisch durch GRK 6 phosphoryliert werden (Violin *et al.*, 2006; Tobin *et al.*, 2008; Nobles *et al.*, 2011).

1.3 β -adrenerge Rezeptoren

β -adrenerge Rezeptoren werden in 3 Subtypen unterteilt: β 1, β 2, β 3 (Bylund *et al.*, 1994). Sowohl der β 1- als auch der β 2-adrenerge Rezeptor sind seit langem pharmakologisch charakterisiert (Lands *et al.*, 1967). β -adrenerge Rezeptoren gehören zum sympathischen Nervensystem und vermitteln muskuläre sowie kardiovaskuläre Antworten durch die Ausschüttung von Adrenalin oder Noradrenalin. Während der β 1AR Adrenalin und Noradrenalin mit gleicher Affinität bindet, weist der β 2AR eine deutlich niedrigere Affinität für Noradrenalin auf (Hoffmann *et al.*, 2004). β 3-adrenerge Rezeptoren, die vorwiegend in Adipozyten zu finden sind und die Lipolyse regulieren, sind weniger catecholaminsensitiv als β 1AR und β 2AR (Trebecka *et al.*, 2009). Da der β 2-adrenerge Rezeptor in dieser Arbeit als Modellrezeptor verwendet wurde, soll im Folgenden auf seine Struktur und Funktionsweise näher eingegangen werden.

1.3.1 Struktur des β 2-adrenergen Rezeptors im inaktiven und aktiven Zustand

Sowohl die inaktive als auch die aktive Kristallstruktur des β 2-adrenergen Rezeptors konnten nach Überwindung methodischer Hürden gelöst werden (Rasmussen *et al.*, 2007; Rasmussen, DeVree, *et al.*, 2011). In allen bisher gelösten Kristallstrukturen verläuft die Faltung in den Transmembranbereichen hochkonserviert. Rezeptorspezifische Strukturunterschiede finden sich aber in den extrazellulären Schleifen, insbesondere in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2). Im β 2-adrenergen Rezeptor, aber auch in anderen Rezeptoren, bildet ECL2 eine Helix entlang der Transmembranbündel und erlaubt so löslichen Liganden aus dem Extrazellulärraum die Ligandenbindetasche, welche durch Helix III, IV, V und VII gebildet wird, zu erreichen (Rosenbaum *et al.*, 2007). In anderen Rezeptoren aber, zum Beispiel im S1P₁R, verschließt ECL2 die Ligandenbindetasche und blockiert damit die Erreichbarkeit aus dem Extrazellulärraum (Hanson *et al.*, 2012).

Überraschenderweise unterscheiden sich die Kristallstrukturen des β 2-adrenergen Rezeptors im agonist- und antagonistengebundenen Zustand nicht sehr stark. Erst durch die Kokristallisation mit einem Gs-Protein oder einem Nanobody, der ein Gs-Protein nachahmt (Nb80), konnte die aktive Struktur gelöst werden (Nygaard *et al.*, 2013; Manglik and Kobilka, 2014). In der Kokristallstruktur liegt der C-Terminus von Gas in einer Tasche, die durch eine Konformationsänderung der Transmembrandomäne (TM) VI zustande kommt. Die Interaktionsstellen zwischen Gas und dem β 2AR liegen in der zweiten intrazellulären Schleife (ICL2) sowie in TMIII, V und VI. Die stärksten Unterschiede des aktivierten β 2AR verglichen mit der Konformation des inaktiven Rezeptors liegen in einer nach außen gerichteten Bewegung von TMVI und einer Ausstülpung der TMV (Rasmussen, DeVree, *et al.*, 2011) (**Abbildung 1.2**). Die sog. Ionensperre („ionic lock“) zwischen dem in Klasse A-Rezeptoren konservierten DRY-Motiv und einer negativ geladenen Aminosäure in TMVI wurde lange Zeit als ein bestimmender Faktor des inaktiven Rezeptorzustandes betrachtet. Jedoch konnte diese Interaktion nicht in der Kristallstruktur mit dem inversen β 2AR-Agonisten Carazolol gefunden werden (Audet und Bouvier, 2012). Auch die aus Rhodopsinstrukturen vorhergesagte Rotamerisierung einiger Aminosäuren in TMVI nach Rezeptoraktivierung konnte in der aktiven Struktur des β 2AR nicht gefunden werden (Audet und Bouvier, 2012).

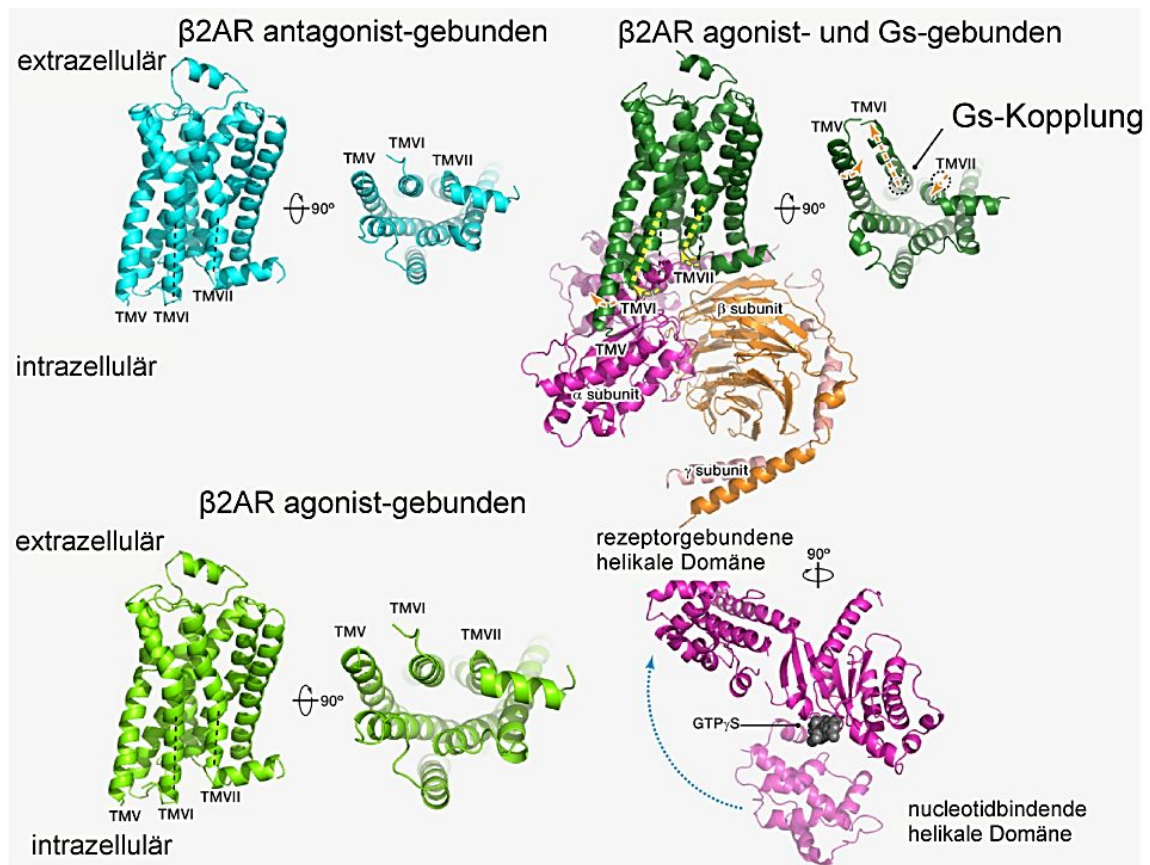


Abbildung 1.2: Aktive und inaktive Konformationen des $\beta 2AR$ Seiten- bzw. Unterseitenansichten des $\beta 2AR$. Oben links: Bindung des partiell inversen Agonisten Carazolol (PDB ID: 2RH1), unten links: kovalente Bindung des $\beta 2AR$ mit dem Agonisten Procaterol (PDB ID: 3PDS). Oben rechts: Bindung an den Agonisten BI-167107 in Gegenwart von $G\alpha\beta_1\gamma_2$ (PDB ID: 3SN6). Schwarz gestrichelte Linie: Position von TMV und TMVII im Zustand der Bindung des inversen Agonisten; gelb gestrichelte Linie: Position der TMV und TMVII im aktiven, Gs- und agonistgebundenen Zustand. Orangefarbene Pfeile kennzeichnen die Richtung der Bewegung der TM vom inaktiven zum aktiven Zustand. Die aktive Form des $\beta 2AR$ konnte nur in Anwesenheit des heterotrimeren G-Proteins und des Agonisten nachgewiesen werden. Die Strukturen in Anwesenheit eines Agonisten oder eines inversen Agonisten sind sehr ähnlich. Unten rechts: Der blaue gestrichelte Pfeil deutet die Bewegung der helikalen Domäne in $G\alpha$ an, wodurch der Nukleotidaustausch katalysiert wird. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Audet und Bouvier, 2012.

1.3.2 Funktionelle Konsequenzen der $\beta 2AR$ -Aktivierung

1.3.2.1 $\beta 2AR$ Kopplung an G-Proteine

Die Bindung eines Agonisten verursacht die Kopplung von Gs-Proteinen an den aktivierten $\beta 2AR$ und erhöht die cAMP-Spiegel der Zelle. Dies führt vermittelt durch PKA in glatten Muskelzellen, z.B. in den Bronchien zur Relaxation (Johnson, 2001). Durch die GRK-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors wird Arrestin rekrutiert, was durch Konkurrenz um die Gs-Proteinbindestelle zur Desensibilisierung des Rezeptors beiträgt siehe (1.5.2, Pippig *et al.*, 1993a). Es konnte gezeigt werden, dass der $\beta 2AR$ auch an

Gi-Proteine koppelt und die Proteinkinase A den molekularen Schalter von der Kopplung zu Gs hin zu Gi-Proteinen darstellt (Daaka *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass β 2AR auf diese Weise zur Kardioprotektion beitragen. So konnte gezeigt werden, dass β 2-adrenerge Rezeptoren einen PI3-Kinase abhängigen, pertussistoxinsensitiven Signalweg in Kardiomyozyten aktivieren, welcher in antiapoptotischen Effekten nach der Induktion von ischämischen Stress resultiert (Chesley *et al.*, 2000). Darüber hinaus spielt die Verteilung von β 2AR und β 1AR im Herzen eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden dass der β 2AR welcher in gesunden Herzmuskelzellen verstärkt in T-Tubuli lokalisiert ist, in Herzinsuffizienzmodellen delokalisiert und über die gesamte Zellmembran verteilt ist. Diese Umverteilung geht auch mit der Umverteilung des durch β 2AR ausgelösten cAMP-Signals einher und ist mit der verstärkten Phosphorylierung von Phospholamban und Arrhythmien assoziiert (Perera und Nikolaev, 2013).

1.3.2.2 β 2AR-Phosphorylierung und ligandenspezifische Signaltransduktion

Der β 2AR wird nach Stimulation mit einem vollen Agonisten insbesondere im proximalen Teil des C-Terminus phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Serin 355, 356 und 364 wird durch GRK vermittelt und trägt maßgeblich zur Desensibilisierung des Rezeptors bei (Seibold *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2006). Weitere Analysen der funktionellen Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen ergaben, dass diese von zentraler Bedeutung für die Interaktion mit Arrestin-3 sind (Krasel *et al.*, 2008). Die Liganden Noradrenalin und Adrenalin sind volle Agonisten in der G-Proteinaktivierung (Bhattacharya *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass das Ausmaß der Arrestin-3-Interaktion mit dem β 2AR nach Stimulation mit Noradrenalin deutlich geringer war als unter Adrenalin-oder Isoprenalinstimulation. Dies zeigt einerseits, dass Noradrenalin vermutlich eine von Adrenalin oder Isoprenalin verschiedene Konformation des Rezeptors auslöst. Andererseits kann daraus geschlossen werden dass die Rezeptorinteraktion mit Arrestin andere bzw. weitere Rezeptorelemente erfordert als die Rezeptorinteraktion mit G-Proteinen (Krasel *et al.*, 2005). Eine spätere Studie zeigt, dass die verringerte Arrestininteraktion unter Noradrenalinstimulation möglicherweise durch eine Reduktion der GRK5 Phosphorylierung an den Serinen 355 und 356 zustande kommt (Reiner *et al.*, 2010).

Seit einigen Jahren gibt es Hinweise, dass GPCR durch Phosphorylierung an bestimmten Stellen zell- und gewebespezifisch Signalwege einleiten können. So konnte durch

phosphospezifische Antikörper am M₃AchR gezeigt werden, dass sich die Phosphorylierungsstärke der Rezeptoren im ZNS von der in Speicheldrüsen oder im Pankreas unterscheidet (Butcher *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte in dieser Studie auch gezeigt werden, dass verschiedene Liganden an bestimmten Serinen im M₃AchR unterschiedlich starke Phosphorylierung auslösen können. Auch am CCR7 (Zidar *et al.*, 2009), am V2R (Ren *et al.*, 2005) und am β 2AR (Nobles *et al.*, 2011) konnte gezeigt werden, dass rezeptorspezifische Phosphorylierung spezifische Signalereignisse hervorrufen kann. Aus diesen Befunden wurde postuliert, dass Phosphorylierungsmuster der Zelle als Kodierung dienen und zur Diversifizierung von Signalwegen beitragen können (Tobin *et al.*, 2008).

In den letzten Jahren ist aus verschiedenen Studien das Konzept der ligandenspezifischen Signaltransduktion entwickelt worden (Reiter *et al.*, 2012). Hierbei geht man von einer Diversifikation der intrinsischen Aktivität durch unterschiedliche Rezeptorkonformationen aus, die durch Interaktion mit bestimmten Liganden ausgelöst wird. Es kann gemäß der Hypothese zum Beispiel eine Rezeptorkonformation stabilisiert werden, welche spezifisch den G-Proteinsignalweg anschaltet, ohne aber die Rezeptorphosphorylierung durch GRK und die Arrestinbindung zu fördern. Vor kurzem wurde am β 2AR gezeigt, dass bestimmte lipidierte Peptide, Pepducine genannt, die strukturell von intrazellulären Schleifen des Rezeptors abgeleitet wurden, spezifisch den Gs-Signalweg einleiten, ohne die Desensibilisierung des Rezeptors zu bewirken (Carr *et al.*, 2014). Obwohl die therapeutische Applikation eines solchen Liganden schwierig sein dürfte, bietet diese Strategie möglicherweise einen neuartigen Ansatz in der Asthmatherapie. Auch Liganden, die spezifisch Signalwege über Arrestine am β 2AR einleiten, sind in der Literatur beschrieben. So spricht man von Carvedilol als „schwach funktionell Arrestin-selektivem Liganden“ (weak-arrestin-biased) (Nobles *et al.*, 2011; Reiter *et al.*, 2012). Eine weitere Studie zeigt, dass der Agonist (R, R')-4-Aminofenoterol spezifisch die Gs-Kopplung des β 2AR induziert und die Gi-Kopplung unterbindet. Die Mutation Y308F im β 2AR hebt diesen Effekt auf (Woo *et al.*, 2014). Interessanterweise ist Y308 im β 2AR zu W422 im M2R homolog. Diese Aminosäure im M2R dient als Kippschalter zur Einleitung des Gi-Signalweges in Gegenwart dualsterischer Agonisten, welche z. B. gleichzeitig an orthosterischen und allosterischen Stellen im Rezeptor binden (Bock, Chirinda, *et al.*, 2014; Bock, Kostenis, *et al.*, 2014).

1.3.2.3 Rezeptordimerisierung

Viele Rezeptoren wie Tyrosinkinase-Rezeptoren, Cytokinrezeptoren oder TNF-Rezeptoren können als Dimere oder Oligomere auftreten. Von GPCR nahm man ursprünglich an, dass sie als Monomere fungieren (Heldin, 1995). Jedoch konnte zunächst an muskarinischen Rezeptoren gezeigt werden, dass diese als Dimere existieren (Maggio *et al.*, 1993). Eine Studie, die an β -adrenergen Rezeptoren durchgeführt wurde, demonstrierte, dass der β 1AR transiente Dimere bildet, während der β 2AR eine starke Oligomerisierung aufweist. Im Gegensatz zu vorher durchgeführten Studien konnte diese Studie durch sorgfältig gewählte Kontrollen zwischen Rezeptordi- und Oligomeren unterscheiden und das Vorkommen dieser Rezeptordi- und Oligomerisierung in physiologischen Systemen beweisen (Dorsch *et al.*, 2009). Die funktionelle Relevanz der Rezeptordi- und Oligomerisierung ist jedoch bisher noch nicht geklärt. Die Bildung von Dimeren scheint aber nicht ligandenabhängig zu sein, auch die Kopplung des β 2AR an Gs-Proteine kann dimerisierungsunabhängig erfolgen (Mercier *et al.*, 2002; Whorton *et al.*, 2007).

1.4 PTH-Rezeptoren

1.4.1 Ligandenbindung und physiologische Funktionen

Im menschlichen Körper werden zwei verschiedene Parathyroidhormonrezeptoren exprimiert, PTHR1 und PTHR2. Der PTHR2 wird hauptsächlich im Gehirn und im Pankreas exprimiert, bindet tuberoinfundibuläres Peptid-39, einen endogenen Peptidliganden (TIP 39) und vermittelt vermutlich neuroendokrine Funktionen (Usdin *et al.*, 1996; Dobolyi *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden die c-terminalen Phosphorylierungsstellen des PTHR1 und deren funktionelle Relevanz für die Interaktion mit Arrestin untersucht, weshalb im Folgenden die Eigenschaften und Funktionen dieses Rezeptors näher beleuchtet werden sollen.

Der PTHR1 wird in Knochen und Nieren exprimiert um den Calcium- und Phosphathaushalt zu regulieren. PTH-Rezeptoren gehören zur Familie B, der Klasse der Peptidhormonrezeptoren. Zu diesen zählen außerdem der Glucagonrezeptor, der Calcitoninrezeptor oder der Vasopressinrezeptor (Hollenstein *et al.*, 2014). Der endogene Ligand für den PTHR1 ist Parathyrin (Parathormon), welches in der Nebenschilddrüse gebildet wird. Parathyrin besteht aus 84 Aminosäuren, wovon die ersten 34 Aminosäuren die volle biologische Aktivität vermitteln (PTH 1-34) (Potts *et al.*, 1971). Daher wird zur

Untersuchung von PTH1-Rezeptoren in der Regel PTH 1-34 eingesetzt. PTH-related peptide (PTH-rP) ist 184 Aminosäuren lang, es gleicht PTH vor allem im N-Terminus, weist aber in den Bereichen 15-34 nur zwei identische Aminosäuren auf. Die Bindungseigenschaften und die Signaltransduktion, die durch PTH-rP ausgelöst werden, ähneln jenen von PTH. Das C-terminale Fragment des Parathormons zirkuliert im Blutkreislauf und durch Zellkultur-Studien ist bekannt, dass dieses bisher nicht näher bestimmte Bindungspartner hat (Divieti *et al.*, 2005; Gardella and Vilardaga, 2015). Die Bindung von PTH 1-34 und PTHrP an den PTHR1 erfolgt gemäß des „Zwei-Seiten-Modells“ in zwei Schritten. Im ersten Schritt bindet der C-Terminus des PTH 1-34-Peptids den extrazellulären N-Terminus des Rezeptors, während im zweiten Schritt die N-Domäne des Liganden mit Transmembrandomänen des Rezeptors in Kontakt tritt (Gardella and Vilardaga, 2015). Der N-Terminus des PTHR1 konnte als Komplex mit PTH 12-34 kristallisiert werden. Die Struktur zeigt, dass PTH 12-34 als amphipathische Helix in eine Furche des PTHR-N-Terminus bindet (Pioszak and Xu, 2008). Über die Interaktionen des Liganden mit der PTHR-Transmembrandomäne (TMD) ist hingegen bisher wenig bekannt. Jedoch wurden kürzlich die Kristallstrukturen des Glucagonrezeptors und des CRF-Rezeptors, beide Vertreter der Klasse B Familie, publiziert (Hollenstein *et al.*, 2013; Siu *et al.*, 2013). Diese Strukturen könnten als Basis für Modelle der PTH-Interaktion mit TMD dienen (Gardella und Vilardaga, 2015).

Die Zellen der Nebenschilddrüse messen den Ca^{2+} - Gehalt des Blutes über den G-Protein-gekoppelten Calcium-Sensing-Rezeptor CaSR. Sinkt der Ca^{2+} - Gehalt des Blutes unter 1,1 mmol/l, wird Parathormon sezerniert (Gardella und Vilardaga, 2015). Zusammen mit Calcitonin und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reguliert PTH die Calciumhomöostase. Durch PTH wird die Ca^{2+} -Rückresorption in den aufsteigenden Teilen der Henle-Schleifen sowie in den distalen Tubuli der Niere gesteigert, die Rückresorption von Phosphat wird gehemmt. PTH fördert die Bildung von Calcitriol in der Niere, wodurch die enterale und renale Calciumresorption gefördert wird (Biber *et al.*, 2009). PTH vermittelt am Knochen sowohl anabole als auch katabole Effekte. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die intermittierende Gabe von PTH 1-34 osteoanabole Effekte, vermutlich durch die verstärkte Proliferation und Differenzierung durch Osteoblasten, vermittelt (Datta und Abou-Samra, 2009). Die anhaltende Gabe von PTH resultiert in verstärkter Knochenresorption durch osteoblasten-vermittelte Aktivierung von Osteoclasten. PTH, PTH-related peptide aber auch Cytokine wie IL-6 und IL-11 stimulieren über ihre Rezeptoren auf Osteoblasten die Bildung von RANKL (auch

OPG oder TRANCE), welcher wiederum die Reifung und Aktivierung von knochenabbauenden Osteoklasten fördert (Teitelbaum, 2000).

1.4.2 PTH1R-vermittelte Signalwege

Die Aktivierung des PTH1R durch hohe, mikromolare Konzentrationen an PTH oder PTHrP führt zu Aktivierung der PLC, während subnanomolare Agonistkonzentrationen vor allem die Adenylylcyclase aktivieren (Bringham *et al.*, 1993). Die Aktivierung der Phospholipase C ist daher wahrscheinlich vor allem dann relevant, wenn die lokalen PTH-Konzentrationen sehr hoch sind, so wie zum Beispiel in der Epiphysenfuge während des Längenwachstums (Datta und Abou-Samra, 2009). Die Umschaltung der Kopplung des PTH1R von Gs- auf Gq-Proteine erfolgt durch die Interaktion eines Na^+/H^+ -Austauschfaktors (NHERF) mit einer PDZ-Domäne im C-Terminus des PTH1R (Mahon *et al.*, 2002) (**Abbildung 1.3**). PTH1-Rezeptoren, deren C-Terminus phosphorylierungsdefizient ist, koppeln besser an PLC als der Wildtyprezeptor, dies legt nahe, dass die PLC-Aktivierung wahrscheinlich durch die Rezeptorphosphorylierung reguliert und desensitiert wird (Tawfeek und Abou-Samra, 2008). Die beschriebene Aktivierung adenylylzyklase-vermittelter und PLC-vermittelter Signalwege wird durch PTH 1-34 induziert. Für kürzere PTH-Analoga mit intaktem N-Terminus konnte die bevorzugte Signaltransduktion über Gs Proteine, verbunden mit erhöhten cAMP Spiegeln, nachgewiesen werden (Carter *et al.*, 1999; Luck *et al.*, 1999). Neben der Kopplung an Gs und Gq-Proteine ist auch beschrieben, dass der PTHR vermittelt durch die Aktivierung von $\text{G}\alpha_{12/13}$ über RhoA die Phospholipase D aktiviert (Singh *et al.*, 2005). Es wurde berichtet, dass der PTH1R mit 14-3-3-Proteinen interagiert, welche an der Regulation der subzellulären Lokalisation von Proteinen beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Ende des PTHR (AS 464-593) mit 14-3-3 interagiert und kolokalisiert (Tazawa *et al.*, 2003). Das Konsensusmotiv für die Interaktion befindet sich zwischen AS 488-495 im proximalen Teil des C-Terminus, welcher auch ein Kernlokalisierungssignal zwischen den Aminosäuren 471-486 im C-Terminus aufweist. Der isoliert exprimierte C-Terminus des PTH1R wird überwiegend im Kern, aber auch im Cytosol gefunden (Tazawa *et al.*, 2003).

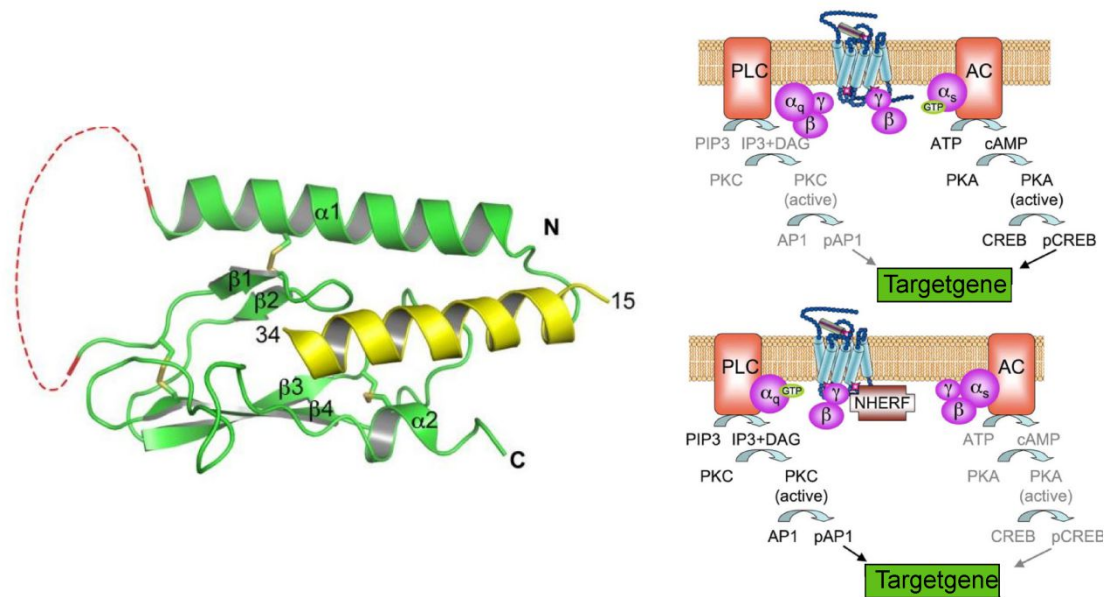


Abbildung 1.3: Ligandenbindung und Signaltransduktion am PTH1R. Links: Struktur des PTH-PTH1R-Komplexes, die extrazelluläre N- Domäne ist in grün dargestellt, PTH 1-34 in gelb. Die Disulfidbrücken sind als Stäbe dargestellt. Die rot gestrichelte Linie beschreibt die Schleifenregion zwischen den Aminosäuren 57-105. (entnommen aus Pioszak *et al.*, 2008) Rechts: Durch NHERF regulierte Signaltransduktion, im oberen Teil sind die durch cAMP regulierten Signalwege dargestellt, die z.B. in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB resultieren. Durch Bindung von NHERF an die PDZ Domäne des PTHR werden Gq-abhängige Signalwege eingeleitet, welche den Transkriptionsfaktor AP1, der sowohl die proliferative als auch apoptotische Genexpression reguliert. Entnommen und modifiziert aus Datta *et al.*, 2009.

1.4.3 PTHR-Phosphorylierung und Arrestin-vermittelte Signalwege

Bisher konnte am Ratten- und am Opossum PTH1R gezeigt werden, dass Ser 473, 475 und 491 durch PKA phosphoryliert werden, während die PKC-Phosphorylierungsstellen nur dem proximalen Teil des C-Terminus zugeordnet, aber nicht exakt lokalisiert werden konnten. Da die pharmakologische Inhibition der PKA bzw. der PKC die agonistvermittelte Phosphorylierung des PTHR nur geringfügig einschränkt, geht man davon aus, dass der Hauptanteil der Serine und Threonine im proximalen C-Terminus durch GRK phosphoryliert wird (Blind *et al.*, 1995, 1996; Tawfeek *et al.*, 2002). Über die Arrestinininteraktion am PTHR ist bisher bekannt, dass die Phosphorylierung des C-Terminus für die stabile Interaktion mit Arrestinen erforderlich ist. Allerdings wurde die robuste Rekrutierung von Arrestin nach Agoniststimulation auch mit einer trunkierten Variante des PTH1R, in welcher der C-Terminus fehlte, beobachtet (Vilardaga *et al.*, 2002). Die Interaktion von Arrestin-3 mit dem PTHR wird durch die Überexpression von NHERF verstärkt und beschleunigt. Darüber hinaus wurde gefunden, dass NHERF, Arrestin-3 und der PTHR einen ternären Komplex bilden (Klenk *et al.*, 2010). Kürzlich publizierte Studien postulieren, dass Arrestin am PTHR entgegen zu seiner sonst

bekannten Funktion zur Desensitierung des Rezeptorsignals beizutragen, zur anhaltenden cAMP-Bildung beiträgt (Feinstein *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Studie wurde gefunden, dass eine Arrestinmutante I386A, V387A, welche konstitutiv mit AP-2 interagiert und in clathrinbedeckten Stachelzellgrübchen verbleibt, einen Komplex mit dem Rezeptor und Gas auf Endosomen bildet und ERK1/2 abhängig die cAMP-Spiegel aufrecht erhält (Burtey *et al.*, 2007; Feinstein *et al.*, 2011).

1.5 Arrestin

Arrestin (auch: β -Arrestin) stellt neben den G-Proteinen einen der wichtigsten Interaktionspartner G-protein-gekoppelter Rezeptoren dar. Die Familie der in Säugern vorkommenden Arrestinproteine weist 4 Mitglieder auf (Gurevich und Gurevich, 2006), wovon Arrestin 1 oder auch visuelles Arrestin sowie Arrestin 4 nur an Photorezeptoren binden (Gurevich *et al.*, 2011). Die nichtvisuellen Varianten Arrestin 2 und Arrestin 3 binden an eine Vielzahl von GPCR und interagieren darüber hinaus auch mit zahlreichen weiteren Proteinen, z.B. mit Proteinen der Internalisierungsmaschinerie oder Elementen des Zytoskeletts (Xiao *et al.*, 2007). Arrestin interagiert bevorzugt mit aktiven, phosphorylierten GPCR (Gurevich *et al.*, 1995; Krasel *et al.*, 2005). Es stabilisiert die aktive Konformation des Rezeptors, fördert die Entkopplung des Rezeptors von G-Proteinen und reguliert die Internalisierung von Rezeptoren und deren zellulären Transport. Zusätzlich zur ihrer ursprünglich entdeckten Rolle der Desensitierung gelten Arrestine auch als Induktoren nachgeschalteter Signalwege (DeWire *et al.*, 2007).

1.5.1 Arrestin-Struktur und Rezeptorinteraktion

Strukturell sind alle 4 Subtypen der Arrestinfamilie sehr ähnlich aufgebaut: Arrestinproteine sind 44-48 kDa schwere, längliche Moleküle, bestehend aus zwei schüsselartigen Domänen mit ähnlichen Zentren. Jede Domäne besitzt etwa 150 Aminosäuren. Kristallstrukturen zeigen, dass Arrestin insgesamt 20 β -Faltblätter und eine α -Helix aufweist (Granzin *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1999). Die β -Faltblätter sind antiparallel angeordnet und entsprechen einem Fibronectin III-Modul (Campbell und Spitzfaden, 1994). Die Aktivierung der Arrestine geschieht durch die Erkennung des phosphorylierten Rezeptors und der nachfolgenden Bindung an den aktivierten und phosphorylierten Rezeptor. Das Modell der Arrestinbindung an den phosphorylierten Rezeptor umfasst zwei Schritte: Zuerst erkennt das Motiv der sogenannten

3-Element-Interaktion (**Abbildung 1.4**) bestehend aus β - Faltblatt 1, α -Helix 1 und dem C-Terminus, phosphorylierte Serine oder Threonine entweder am C-Terminus oder in der 3. intrazellulären Schleife des Rezeptors (Wu *et al.*, 1997). Dann erfolgt das Aufbrechen einer Salzbrücke der 3-Element-Interaktion, was die Orientierung der Phosphatgruppen des Rezeptors in Richtung des zentralen polaren Kerns des Arrestins und damit dessen Aktivierung zur Folge hat. Hierbei wird eine globale Konformationsänderung des Arrestins induziert, wobei der C-Terminus freigelegt wird und nun zur Interaktion mit weiteren Proteinen wie zum Beispiel AP-2 und Clathrin zur Verfügung steht (Gurevich und Gurevich, 2006). Der Ablauf des Erkennungsmechanismus des phosphorylierten Rezeptors ist innerhalb der vier humanen Arrestine stark konserviert. Jedoch unterscheiden sich Arrestine in ihrer Rezeptorselektivität. Nach innen gewölbte N-bzw. C-terminale Elemente weisen zusätzliche Elemente auf, welche sich dem aktivierten, phosphorylierten Rezeptor sattelartig anpassen. In visuellem Arrestin sind phosphatbindende Lysine und Arginine in den β -Faltblättern 5 und 6 des N-Terminus an der Rezeptorbindung beteiligt. Bei Arrestin-2 sind β -Faltblätter 5, 6, 9, 10 und ihre Verbindungsschleifen des N-Terminus sowie die β -Faltblätter 15 und 16 im C-Terminus an der Rezeptorbindung beteiligt (Milano *et al.*, 2002; Vishnivetskiy *et al.*, 2004). Die Zerstörung des polaren Kerns durch die Mutation R169E oder die Deletion des C-Terminus von Arrestin-2 führt zu einer konstitutiv aktiven Variante des Proteins, welche phosphorylierungsunabhängig an den β 2-adrenergen Rezeptor bindet (Kovoor *et al.*, 1999).

Durch die Phosphorylierung durch GRK wird die Affinität vom Rezeptor zu Arrestinen 20-40 fach erhöht (Lohse, 1993). Obwohl dieser Befund für zahlreiche GPCR gilt, ist hervorzuheben, dass der Zusammenhang zwischen Arrestininteraktion und Rezeptorphosphorylierung nicht streng konserviert abläuft. So gibt es Rezeptoren, die Arrestin phosphorylierungsunabhängig binden können, dazu gehören der PAR-1 Rezeptor, den Leukotrien B4-Rezeptor oder der Substanz P-Rezeptor (Richardson *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Jala *et al.*, 2005). Dort, wo die Rezeptorphosphorylierung keine Rolle für die Rekrutierung von Arrestin spielt, scheint allein die aktive Rezeptorkonformation auszureichen, um einen funktionellen Arrestin-Rezeptorkomplex zu generieren (Tobin *et al.*, 2008). Im Fall des Chemokin-Rezeptors D6 oder im Fall des LH-Rezeptors können negativ geladene Aminosäuren eine phosphomimetische Funktion erfüllen und Arrestin aktivieren (Mukherjee *et al.*, 2002; Galliera *et al.*, 2004).

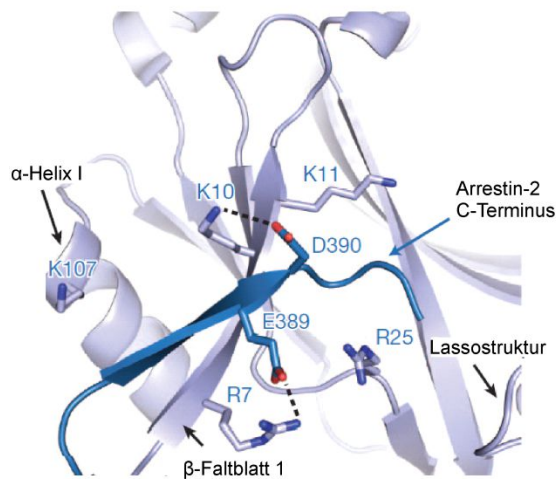


Abbildung 1.4: 3-Element-Interaktion In der inaktiven Konformation wird der C-Terminus von Arrestin-2 durch die 3-Element-Interaktion in der N-Domäne festgehalten. Die 3-Element-Interaktion besteht aus ionischen Wechselwirkungen zwischen Asparaginsäure und Lysin, bzw. Glutamat und Arginin, sowie aus einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen α -Helix I und β -Faltblatt I. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Shukla *et al.*, 2013.

1.5.2 Arrestin beeinflusst die Desensibilisierung und Internalisierung von Rezeptoren

Ein wichtiges Phänomen der Rezeptorpharmakologie ist die Desensibilisierung. Hierbei kann trotz der fortwährenden Anwesenheit eines Agonisten das Maximum der Rezeptorantwort nicht dauerhaft aufrechterhalten werden, dies bezeichnet man auch als pharmakodynamische Toleranz. Im Fall einer Arzneistoffapplikation kann dieser Effekt unerwünscht sein, allerdings kann dieser Mechanismus die Zelle auch vor massiver Überstimulation bewahren. Die Desensibilisierung von GPCR kann durch homologe oder heterologe Mechanismen ausgelöst werden. Die heterologe Desensibilisierung wird durch Effektorkinasen wie z.B. PKA oder PKC vermittelt. Wird zum Beispiel ein Gs-gekoppelter Rezeptor aktiviert, phosphoryliert die cAMP-abhängige Proteinkinase A neben den Zielproteinen auch den Rezeptor selbst an Konsensusmotiven (Ubersax und Ferrell Jr, 2007). Die Phosphorylierung verändert die Konformation des Rezeptors, sodass die Affinität für G-Proteine sinkt. Durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus werden auch nicht aktivierte Rezeptoren phosphoryliert, die den PKA oder den PKC-Signalweg einleiten können, weshalb diese Art der Desensibilisierung als unspezifisch gilt (Lohse, 1993). Die homologe Desensibilisierung hingegen, wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) ausgelöst, die nur aktivierte GPCR phosphorylieren (Benovic *et al.*, 1986). Im Gegensatz zur heterologen Desensibilisierung wird die homologe Desensibilisierung innerhalb weniger Sekunden eingeleitet und findet

rezeptorspezifisch statt (Roth *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung durch GRK initiiert in vielen Fällen die Bindung von Arrestin an Rezeptoren (Lohse *et al.*, 1990). Die Bindung von Arrestin führt zu sterischen Inhibition der Interaktion zwischen Gs-Proteinen und dem Rezeptor und verstärkt damit die homologe Desensibilisierung von Rezeptoren (Pippig *et al.*, 1993). Darüber hinaus werden durch Arrestine die Phosphodiesterase 4 (PDE4) sowie Diacylglycerolkinasen (DGK) rekrutiert. Dadurch trägt Arrestin zum Abbau der „second messenger-Moleküle“ cAMP und DAG bei (Perry *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2007).

Die Fähigkeit von Rezeptoren, nach Agonistexposition zu internalisieren, beschränkt sich nicht allein auf GPCR, sondern ist nahezu universell für alle Rezeptoren ausgeprägt (Kovanen *et al.*, 1979; Moore *et al.*, 2007). Viele GPCR internalisieren über clathrinbedeckte Stachelgrübchen, aber es existieren auch andere Mechanismen (Shenoy und Lefkowitz, 2011). So wurde erst kürzlich gezeigt, dass der $\beta 1$ -AR, der D_3 R oder der α_{2A} AR unabhängig von Clathrin und AP-2, sondern vermittelt durch Endophilin internalisieren (Boucrot *et al.*, 2014). Die clathrinabhängige Endozytose wird durch Arrestin vermittelt (Goodman *et al.*, 1996). Clathrinbedeckte Stachelgrübchen sind Einschnürungen an der Plasmamembran, die mit AP-2 und Clathrin ummantelt sind. Durch die Aktivität der GTPase Dynamin werden clathrinbedeckte Stachelgrübchen als Vesikel abgeschnürt, was in der Internalisierung der Zelloberflächenrezeptoren resultiert (Shenoy und Lefkowitz, 2011). Die Überexpression von Arrestin verstärkt die Endozytose des $\beta 2$ AR und kann die Internalisierung endozytosedefizienter Rezeptoren retten (Ferguson *et al.*, 1996). Dies geschieht durch die direkte Interaktion eines hochkonservierten Motivs im C-Terminus von Arrestin-2 (LIELD) und Arrestin-3 (LIEFE) mit Clathrin (Mangmool *et al.*, 2006). Im Laufe der Zeit konnten zusätzliche Bindungspartner, die an der Internalisierung von Arrestin beteiligt sind, aufgefunden werden. Dazu gehört der Clathrinadapter AP-2, der über F319 mit Arrestin-2 interagiert (Kim und Benovic, 2002). Weitere Proteine, die eine Adapterfunktion bei der arrestin-vermittelten Endozytose von GPCR erfüllen, sind NSF (N-Ethylmaleimid-sensitiver -Faktor), das kleine G-Protein ARF6 und die PI4P Kinase (Claing *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2008).

1.5.3 Arrestin-posttranslationale Modifikationen

Arrestin-2 und Arrestin-3 können durch Ubiquitinierung, Phosphorylierung, SUMOylierung oder Nitrosylierung posttranslational modifiziert werden (Shenoy und Lefkowitz, 2011). Im Basalzustand im Cytosol werden Arrestin-2 und Arrestin-3 am

C-Terminus in der Nähe der Interaktionsstellen für Clathrin und Adaptin phosphoryliert. Arrestin-2 wird an Serin 412 durch ERK phosphoryliert (Lin *et al.*, 1999), Arrestin-3 wird an Serin 361 und an Threonin 383 durch die Casein Kinase II phosphoryliert (Kim *et al.*, 2002). Die Rekrutierung an aktivierte GPCR führt zur Dephosphorylierung von Arrestin-2 oder Arrestin-3 und ist essentiell für die Clathrin-vermittelte Endozytose des Rezeptors. Sobald Arrestin-2 oder Arrestin-3 von clathrinbesetzten Stachelgrübchen ummantelt sind, findet die Rephosphorylierung statt (Lin *et al.*, 1997). Durch die Phosphorylierung an Tyrosin 54 in Arrestin-2 durch die Tyrosinkinase Src wird die Interaktion zwischen Arrestin-2 und AP-2 inhibiert (Marion *et al.*, 2007). Die S-Nitrosylierung eines C-terminalen Cysteins in Arrestin-3 verstärkt die Arrestininteraktion mit der Endozytosemaschinerie und beschleunigt die Internalisierung des β_2 -adrenergen Rezeptors (Ozawa *et al.*, 2008). Diese Modifikation scheint spezifisch für Arrestin-3 zu sein da weder Arrestin-2 noch visuelles Arrestin Cysteine im C-Terminus aufweisen und über S-Nitrosylierung an anderen Stellen keine Daten vorliegen (Aubry und Klein, 2013).

Wie in **Abbildung 1.4** gezeigt, dienen Lysin 10 und 11 in Arrestin-2 (entspricht K11, 12 in Arrestin-3) dazu, Arrestin im Basalzustand in der „Drei-Element-Interaktion“ zu stabilisieren. Diese beiden Lysine dienen als initiale Erkennungselemente von Phosphatgruppen im C-Terminus aktivierter Rezeptoren, die dann zum polaren Kern geführt werden um dort Salzbrücken aufzubrechen und Arrestin zu aktivieren (Vishnivetskiy *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde berichtet, dass die Ubiquitinierung an Lysin 11,12 in Arrestin-3 über die Stabilität der Arrestininteraktion mit bestimmten GPCR entscheidet (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Die Stabilität der Arrestin-Rezeptorinteraktion scheint sehr wichtig für die Kointernalisierung von Arrestin-Rezeptorkomplexen zu sein. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass ubiquitinierte Rezeptor-Arrestinkomplexe die Phosphorylierung von ERK1/2 auslösen (Shenoy *et al.*, 2007). Jedoch wurde die stabile Interaktion von Arrestin mit Rezeptoren in früheren Studien auf das Vorhandensein bestimmter phosphorylierter Stellen im C-Terminus von Rezeptoren zurückgeführt (Oakley *et al.*, 2001). Die Untersuchung der Stabilität der Interaktion zwischen Arrestin und GPCR ist zentraler Gegenstand dieser Arbeit und wird daher in allen Abschnitten des Ergebnisteils aus verschiedenen Richtungen beleuchtet. Eine weitere ubiquitinähnliche posttranslationale Modifikation stellt die Sumoylierung von Arrestin-2 und Arrestin-3 dar. Am β_2 -adrenergen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die Sumoylierung von Arrestin-3 an Lysin 400 im C-Terminus die Rezeptorinternalisierung fördert (Wyatt *et al.*, 2011).

1.5.4 Arrestin-Interaktionspartner

Proteomanalysen haben ergeben, dass Arrestin-2 mit 71 und Arrestin-3 mit der beeindruckenden Anzahl von 164 verschiedenen Proteinen interagieren kann (Xiao *et al.*, 2007). Für die meisten der gefundenen Arrestin-Interaktionspartner stehen die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Interaktion jedoch nach wie vor aus. Bisher konnten nur zwei Proteine identifiziert werden, die mit der Oberfläche in Arrestin in Kontakt treten, welche mit nicht phosphorylierten Stellen im Rezeptor interagiert (Gurevich VV and Gurevich, 2013). Dies sind Tubuline, die das Cytoskelett bilden und Ca^{2+} -gebundenes Calmodulin. Verglichen mit der Affinität von Arrestin zu Rezeptoren ist die Affinität der Interaktion mit Calmodulin und Tubulin jedoch eher gering (Wu *et al.*, 2006). Die meisten anderen Interaktionspartner wie Clathrin, oder AP-2 binden Arrestin verstärkt, wenn dieses gleichzeitig am Rezeptor bindet (Goodman *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1999). Wie bereits angesprochen, befinden sich die Interaktionsstellen von Arrestin mit Clathrin oder AP-2 im C-Terminus von Arrestin. Sie repräsentieren die am besten charakterisierten Interaktionspartner von Arrestin und konnten auch zusammen mit Arrestin kokristallisiert werden. Durch die Kokristallisationsstudie stellte sich heraus, dass eine lange Spleißvariante von Arrestin-2 (arrestin2L) ein zusätzliches Clathrinbindemotiv in Form einer acht Aminosäuren langen Schleife im C-Terminus aufweist. Diese ist in allen Arrestinen außer in Arrestin-3 und der kurzen Spleißvariante von Arrestin-2 vorhanden. (Schmid *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2009). Sowohl N- als auch C-terminale Elemente in Arrestin können mit der cAMP Phosphodiesterase PDE4D5 interagieren (Baillie *et al.*, 2007). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass nach der Stimulation β 2-adrenerger Rezeptoren Epac1 und PDE4D5 um die Interaktion mit Arrestin-3 kompetitieren. Die Dissoziation des PDE4D5-Arrestin-3-Komplexes ermöglichte die Rekrutierung von Epac1 an den β 2AR, was eine Umschaltung des Signals auf den β 1AR mit der Einleitung einer pro-hypertrophen Signalkaskade zur Folge hatte (Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013).

Dass durch die Stimulation von GPCR Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) aktiviert werden, ist seit etwa 20 Jahren bekannt (Mitchell *et al.*, 1995). Der Befund, dass Arrestin ein Bindungspartner für MAPK ist und diese ebenfalls aktivieren kann, erweiterte das Verständnis von Arrestin als Protein zur Signalabschaltung hin zu einem Protein, welches selbst in der Lage ist, Signalwege zu induzieren (McDonald *et al.*, 2000; Shenoy *et al.*, 2007). Die MAPK-Kaskade involviert drei Kinasen, die sich sequentiell gegenseitig

aktivieren; dazu gehören MAPKKK wie Ask-1 oder c-Raf1, MAPKK, zu denen MEK1 oder MKK4 zählen, sowie MAPK wie ERK1/2 oder JNK3 (Gurevich VV und Gurevich, 2013). Man geht heute davon aus, dass alle MAPK sowohl mit N- als auch mit C-terminalen Domänen von Arrestinen interagieren können (Song *et al.*, 2009). Die G-Protein-abhängige Aktivierung von MAPK führt zur Translokation von ERK1/2 in den Zellkern, während die arrestin-abhängige Aktivierung von ERK 1/2 die Retention des Arrestin-3-ERK 1/2-Komplexes im Cytosol bewirkt, da in Arrestin-3 ein nukleares Exportsignal vorhanden ist. Darüber hinaus verläuft die G-Protein-abhängige Phosphorylierung von MAPK eher transient, während die arrestinabhängige MAPK-Aktivierung länger anhält (Ahn *et al.*, 2004). Das Ausmaß der ERK1/2-Aktivierung ist nicht nur von der Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen abhängig, sondern scheint auch GRK-abhängig zu sein. So führt die Überexpression von GRK 5 und GRK 6 zu einer verstärkten ERK1/2 Aktivierung, was von der stabilen Assoziation von Arrestin-3 mit dem β 2-adrenergen Rezeptor auf Endosomen begleitet ist (Shenoy *et al.*, 2006). Es ist davon auszugehen, dass durch die G-Protein vermittelte Translokation von ERK 1/2 die Zellproliferation gefördert wird. So zeigt eine Untersuchung aus dem Jahr 2003, in welcher der C-Terminus des V2R durch den des β 2AR ersetzt wurde, einen schwachen Rückgang in der ERK-Phosphorylierung mit einer V2- β 2-Chimäre, welche nur in einer Co-Immunpräzipitation mit Arrestin, aber nicht im Totallysat sichtbar war. Mit dieser Rezeptorchimäre konnte ein leichter Anstieg der DNA-Synthese vermittelt durch Vasopressin verzeichnet werden. Umgekehrt führte die Retention von ERK 1/2 durch Komplexbildung mit Arrestin-3 zu Abschwächung der Transkription (Tohgo *et al.*, 2003). Demnach scheint die arrestin-abhängige Aktivierung von ERK 1/2 nicht die Zellproliferation zu fördern (DeFea *et al.*, 2000).

Alle 4 Arrestine können die MAPK JNK3 binden, jedoch nur Arrestin-3 kann sie auch aktivieren (Gurevich VV und Gurevich, 2013). Anfänglich dachte man, dass Arrestin-3 die ASK-1-MKK4-JNK3 Kaskade vor allem stimulusabhängig einleiten kann (McDonald *et al.*, 2000), spätere Studien zeigten dagegen, dass Arrestin-3 auch im Basalzustand die Translokation von JNK3 aus dem Nucleus ins Cytoplasma und dessen Aktivierung bewirken kann (Gurevich VV und Gurevich, 2013). Die Aktivierung von ERK1/2 ist hingegen von der rezeptorgebundenen Arrestinform abhängig und damit an die Aktivierung und Phosphorylierung eines GPCRs gebunden. Die Interaktionsstellen von Arrestinen mit MAPK sind bisher nicht bekannt, allerdings gibt es Mutationsstudien, in welchen die Affinität von Arrestin-3 oder Arrestin-3 zu unterschiedlichen Komponenten

der MAPK-Kaskade manipuliert werden konnte. Ob dies durch direkte oder indirekte Beeinflussung der Interaktion zustande kam ist noch unklar (Coffa *et al.*, 2011; Gurevich VV und Gurevich, 2013). Ebenso wie für die Komponenten der MAPK-Kaskade sind die Interaktionsstellen von Arrestin mit der Tyrosinkinase c-Src bisher nicht bekannt. Arrestin-1,-2 und -3 können Src nach GPCR Stimulation an die Plasmamembran rekrutieren. Die Interaktion zwischen Src und Arrestin ist ein notwendiges Kriterium für die ERK1/2-Aktivierung (Luttrell *et al.*, 1999).

1.5.5 Arrestin-Physiologie und- Pathophysiologie

1.5.5.1 Die Rolle von Arrestin in der Entwicklung

In Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von Arrestin-2, aber nicht von Arrestin-3, die frühe Hämatopoese beeinträchtigt. Als Ursache hierfür wurde ein mit dem Arrestin-2-Knockdown einhergehender Rückgang der Transkription der für die Entwicklung von Blutzellen wichtigen Gene *CDX4* und *Hdx* gefunden (Davidson *et al.*, 2003). Arrestin spielt auch eine Rolle im Frizzled-Rezeptor-Signalweg. Frizzled sind GPCR, denen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, der Zellmigration oder der Regulation der Zellpolarität zukommt (Huang und Klein, 2004). Durch Stimulation von Frizzled mit dem Liganden Wnt, einem Lipoglycoprotein, wird Dishevelled (Dsh) an die Plasmamembran rekrutiert und es wurde berichtet, dass Arrestin-3 mit Dsh interagiert. Die Interaktion von Arrestin-3 mit Dsh vermittelt die Aktivierung von Rho A und JNK in embryonalen Dorsalzellen (Kim und Han, 2007). Ein zentraler Signalweg der Kleinhirnentwicklung in der Embryogenese wird durch Bindung des Liganden Hedgehog (Hh) an den atypischen GPCR Smo (smoothened) eingeleitet. Nach Stimulation von Smo bindet Arrestin und vermittelt den Transport dieses Rezeptors in primären Zilien (Barakat *et al.*, 2013). (Dieser Absatz wurde zusammengefasst bzw. ergänzt aus Philipp *et al.*, 2013).

1.5.5.2 Die Rolle von Arrestin in der kardiovaskulären Signaltransduktion

Da in Arrestin-2-Knockoutmäusen die durch Isoproterenol ausgelöste kardiale Kontraktion verstärkt ist, kann man davon ausgehen, dass Arrestin-2 im Herzen die klassische Rolle der Desensibilisierung innehat (Conner *et al.*, 1997). In einer neueren Studie hingegen konnte gezeigt werden, dass der EGFR in Anwesenheit von Arrestin-2 bzw. Arrestin-3 durch Stimulation des β 1-AR transaktiviert wurde. Dies war abhängig von der Phosphorylierung

des β 1-AR. Die Transaktivierung des EGFR unter Katecholaminstress vermittelte kardioprotektive Effekte, verglichen zu Bedingungen in welchen die Transaktivierung des EGFR durch Erlotinib unterbunden war (Noma *et al.*, 2007). Dementsprechend kann die Funktion von Arrestin in der kardiovaskulären Signaltransduktion als divergent betrachtet werden.

1.5.5.3 Die Rolle von Arrestin in Tumoren

Zelluläre Prozesse wie Migration, Proliferation und Metastasierung sind mit Krebs assoziiert und werden unter anderem durch Arrestine reguliert. Die meisten Studien zur Untersuchung der Rolle von Arrestinen in Tumoren wurden in Krebszellmodellen und weniger in klinischen Studien durchgeführt (Sobolesky und Moussa, 2013). So konnte in Blasenkrebszellen gezeigt werden, dass die Stimulation des Thromboxanrezeptors vom Subtyp β , welcher im Gegensatz zum Thromboxanrezeptor α mit Arrestin interagiert, zur verstärkten Zellmigration- und Invasion führt. Der spezifische Knockout von Arrestin-3, aber nicht von Arrestin-2, konnte die durch den Liganden U46619 induzierte Migration und Invasion der Tumorzellen einschränken (Moussa *et al.*, 2008). In Darmkrebsmodellen wiederum konnte gezeigt werden, dass Arrestin-2 für die verstärkte Zellproliferation von Tumorzellen verantwortlich ist. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die durch PGE_2 Stimulation ausgelöste Transaktivierung des EGFR. Die Transaktivierung des EGFR wird durch die Interaktion von Arrestin-2 mit der Tyrosinkinase c-Src kontrolliert (Buchanan *et al.*, 2006). Es wird vermutet dass Arrestine eine antiapoptotische Rolle einnehmen. Zum Beispiel wurde gefunden, dass die Apoptose durch Arrestin-3 in endometrialen Krebszellen negativ reguliert wird. Die Überexpression von Arrestin-3 verringert die Apoptose sowie die Aktivierung der Caspase-3, außerdem werden auch die p-Akt und pGSK3 β Spiegel gesenkt (Sun *et al.*, 2010). Arrestin-2 liegt in derselben chromosomalen Region wie das CCND1-Gen, welches mit der Koamplifikation verschiedener Onkogene bei Brustkrebs assoziiert ist. Aus diesem Grund wurde die Arrestin-2-Expression in einer klinischen Studie untersucht. In der ersten Kohorte war die erhöhte Arrestin-2 Expression in stromalen Zellen mit einer geringeren Überlebenschance der Patientinnen verbunden, während in der zweiten Kohorte, bei der entweder Tamoxifen als Adjuvans gegeben wurde oder nicht, sowohl die hohe als auch die nicht vorhandene stromale Expression von Arrestin-2 mit einer geringeren Überlebenschance assoziiert war. Es profitierten jedoch nur die Patientinnen mit hoher oder nicht vorhandener stromaler Arrestin-2 Expression von Tamoxifen als Adjuvans. Überraschenderweise war eine umgekehrte Korrelation zwischen

der Amplifikation des CCND1-Gens und der Expression von Arrestin-2 feststellbar (Lundgren *et al.*, 2011).

1.5.5.4 Die Rolle von GPCR und Arrestin bei der Alzheimer Erkrankung

Sowohl der β 2AR als auch der „Waisenrezeptor“ GPR3 regulieren die Bildung des Amyloid- β -Peptids (A β), welches eine Komponente cerebraler Plaques bei der Alzheimer-Erkrankung ist (Wolfe, 2013). Die agonistinduzierte Endozytose des β 2AR resultiert in einer Kointernalisierung von Rezeptoren mit dem γ -Sekretase-Komplex auf Endosomen. Man geht davon aus, dass die saure endosomale Umgebung die γ -Sekretase-Aktivität erhöht und zur verstärkten Produktion von A β beiträgt (Ni *et al.*, 2006). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Arrestin-3 mit dem γ -Sekretase-Komplex über dessen Aph-1-Untereinheit interagiert und zum Transport in Lipidflöße („lipid rafts“) oder Endosomen beiträgt um dort die γ -Sekretase-Aktivität zu steigern (Liu *et al.*, 2012; Thathiah *et al.*, 2012). In beiden Studien konnte auch gezeigt werden, dass die Bildung von A β -Plaques in Alzheimermodellsystemen durch den genetischen Knockout von Arrestin-3 stark vermindert wird.

1.6 Biophysikalische Messmethoden

Zur Erfassung der zeitlichen Stabilität und zellulären Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen kamen in dieser Arbeit verschiedene biophysikalische Messmethoden zum Einsatz. Um das Ausmaß und die Lokalisation der Rezeptorphosphorylierung zu bestimmen, wurden biochemische sowie massenspektrometrische Analysen herangezogen. Im Folgenden soll auf die Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten dieser Methoden etwas näher eingegangen werden:

1.6.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

In den 1920er Jahren wurden erstmals Dipol-Dipol-Interaktionen beschrieben, die 1948 von Theodor Förster als FRET konkretisiert wurden (Förster, 1948; Shrestha *et al.*, 2015). Das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (auch: Förster-Resonanz-Energietransfer) besteht im strahlungslosen Energieübertrag eines angeregten Donorfluorophors auf einen Akzeptorfluorophor. Der Donor absorbiert Lichtenergie bei kürzeren Wellenlängen als der Akzeptor (Nagy *et al.*, 2005). Der ideale Abstand der Fluorophore für FRET beträgt 1-10 nm (Katenkamp, 1980). Wenn sich zwei Fluorophore

in geeigneter räumlicher Nähe und Orientierung zueinander befinden, werden durch FRET die spektroskopischen Eigenschaften wie Fluoreszenzintensität, Lebensdauer der Fluoreszenz, Quantenausbeute und Anisotropie der Fluorophore verändert (Lidke *et al.*, 2003). Die Energieüberträge der Donor- und Akzeptoranregung- bzw. emission sind im Jablonski-Diagramm in **Abbildung 1.5** veranschaulicht. Gemäß Förster ist die FRET-Effizienz (E) folgendermaßen definiert:

$$E = \frac{R_0^6}{R_t^6 + R_0^6}$$

R_t definiert den tatsächlichen Abstand zwischen Donor und Akzeptor, während R_0 den Försterabstand bezeichnet bei welchem die Wahrscheinlichkeit des Energieübertrags 50 % beträgt. Die Wahrscheinlichkeit des Energieübertrags sinkt demnach mit der sechsten Potenz des Abstandes zwischen den FRET Partnern und ist im Wesentlichen von R_t , dem tatsächlichen Abstand der Fluorophore abhängig.

$$R_0 = 0,02108 [\kappa^2 \times \Phi_D \times n^{-4} \times J]^{\frac{1}{6}} \text{ nm}$$

κ^2 : relative Orientierung zwischen den Dipolen der Donoremission und der Akzeptorabsorption

Φ_D : Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

n : Brechungsindex der Umgebungslösung

J : Ausmaß der Überlappung des Donoremissions- und des Akzeptorabsorptionsspektrums

In der Praxis bedeutet dies, dass folgende Kriterien zu Beobachtung von FRET erfüllt sein müssen: (1) Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. (2) Der Donor muss über eine hohe Quantenausbeute verfügen. (3) Die Dipolmomente der Donoremission und der Akzeptorabsorption müssen in günstiger, paralleler Orientierung zueinander stehen (Shrestha *et al.*, 2015).

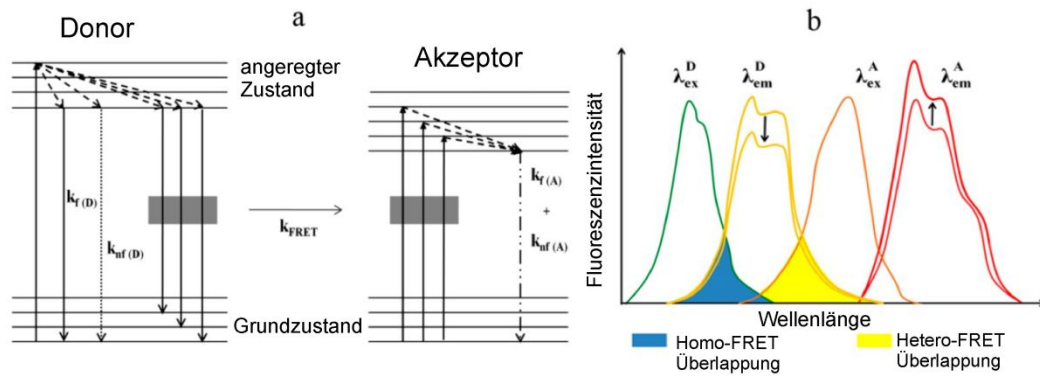


Abbildung 1.5: Energiezustände beim FRET a) Das Jablonski Diagramm zeigt, dass die Elektronen des Donors und des Akzeptors nach Energieaufnahme aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt werden. Auf dem Rückweg in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht beschrieben durch die Konstante $k_{f(D)}$ bzw. $k_{f(A)}$ oder durch nicht fluoreszierende Prozesse $k_{nf(D)}$ bzw. $k_{nf(A)}$ abgegeben. Im Fall des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers wird die Anregungsenergie des Donors durch den Akzeptor absorbiert. Dies wird durch die Konstante k_{FRET} beschrieben. b) Spektrale Überlappung: Die Symbole λ_{ex}^D , λ_{em}^D , λ_{ex}^A , λ_{em}^A kennzeichnen die Emission bzw. die Absorption der Donor- bzw. Akzeptorfluorophore. Die Pfeile kennzeichnen den Energieverlust des Donors und den Energiegewinn des Akzeptors durch FRET. Homo-FRET: Energieübergänge zwischen gleichen Fluorophoren. Hetero-FRET: Energieübergänge zwischen unterschiedlichen Fluorophoren. Die Abbildung wurde modifiziert nach Shrestha *et al.*, 2015.

1.6.1.1 FRET in experimenteller Anwendung

1.6.1.1.1 Dynamische FRET-Experimente

Die FRET-Methode eignet sich hervorragend, um dynamische Prozesse wie Proteininteraktionen oder konformationelle Änderungen eines Proteins in Echtzeit zu erfassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dynamische FRET-Experimente mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Proteine durchgeführt. Dabei wurde die cDNA der Proteine von Interesse mit einem cyan fluoreszierenden Protein (CFP) oder einem gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) mit Hilfe der Standardmethoden der Molekularbiologie verknüpft und per Transfektion in HEK293T-Zellen eingebracht. CFP als Donorfluorophor wurde bei einer Wellenlänge von 415 nm angeregt und die Emission der Donor- und Akzeptorfluorophore wurden vor, während und nach der Applikation eines Stimulus in hoher zeitlicher Auflösung detektiert. Bei den intermolekularen FRET-Messungen die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestand zu Beginn der Messung kein FRET, sondern wurde erst durch konformationelle Änderungen von Rezeptorproteinen, G-Proteinen oder Arrestinen nach Ligandenstimulation ausgelöst (**Abbildung 1.6**). Dabei waren der Rückgang der Fluoreszenz des Donors und eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz messbar, was im Anstieg des FRET-Ratios F_{YFP}/F_{CFP} resultierte. Die Durchführung und Auswertung der Messungen sind unter 2.2.4.1 beschrieben. Dynamische FRET-Messungen können auf

Basis inter-oder intramolekularer FRET-Änderungen durchgeführt werden. Bei intramolekularen FRET-Änderungen befinden sich der Donor- und der Akzeptorfluorophor im gleichen Protein, wodurch die Detektion konformationeller Änderungen ermöglicht wird. Intermolekulare FRET-Anwendungen wie oben beschrieben, eignen sich vor allem für die zeitliche Analyse von Proteininteraktionen. Beide Methoden eignen sich gleichermaßen für die Interpretation der FRET-Amplituden, welche oft für Konzentrations-Wirkungsmessungen herangezogen werden. Soll das Ausmaß der intermolekularen FRET-Änderungen in verschiedenen Messungen verglichen werden, so sind die Expressionsverhältnisse beider Fluorophore zu bestimmen. Dies ist erforderlich, da die Überexpression des donormarkierten Proteins bei der ratiometrischen Auswertung die Amplituden künstlich verkleinern kann (s. 2.2.4.1.3).

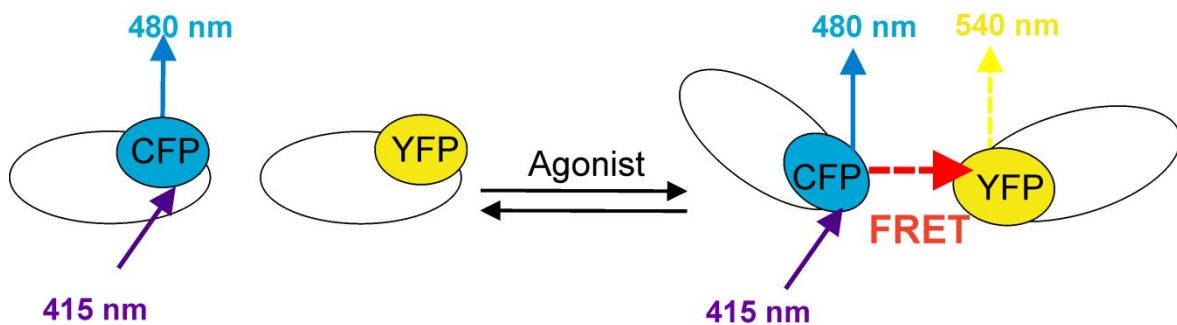


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers.

1.6.1.1.2 FLIM-FRET

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) misst die Dauer der Anregungszustände von Donorfluorophoren. Wenn FRET auftritt, ist die Dauer angeregter Zustände entsprechend verkürzt. Bei FLIM-basierten FRET-Messungen können Artefakte durch Variationen der Fluorophorkonzentrationen oder Bleichen ausgeschlossen werden. Dadurch, dass bei dieser Methode nur die Donorfluoreszenz erfasst wird, spielt der Durchtritt der Donorfluoreszenz in den Emissionsbereich der Akzeptorfluoreszenz hier keine Rolle (Elangovan *et al.*, 2002).

1.6.1.1.3 Akzeptorbleichen

Die Methode des Akzeptorbleichens eignet sich, um die FRET-Effizienz eines bestehenden FRET-Signals zu ermitteln. Dabei wird der Akzeptor durch starke Belichtung gebleicht, weshalb kein Energietransfer durch den Donor mehr möglich ist. Infolgedessen nimmt die Fluoreszenz des Donors zu und kann Aufschlüsse über das Ausmaß des vorher stattgefundenen FRET-Signals geben.

1.6.1.1.4 Einzelmolekül-FRET

Einzelmolekül-FRET (sm-FRET) erlaubt detaillierte Einblicke in die Bewegungen eines Proteins auf molekularer Ebene. Bei dieser Methode werden an ausgesuchten Stellen im Protein Cysteine exprimiert, deren Sulfhydrylgruppen man mit einer Maleimid- oder Succinimidgruppe kleiner chemischer Fluorophore wie Cy3 und Cy5 reagieren lässt. Die auf diese Weise gelabelten Proteine erlauben die Beobachtung konformationeller Änderungen wie Rotationen und Distanzänderungen im nm-Bereich. Die Limitationen dieser Anwendung bestehen einerseits im Verlust des physiologischen Umfeldes der Proteine, da oft gereinigte Proteine für in vitro-Anwendungen eingesetzt werden, andererseits ist die FRET-Lebensdauer sehr kurz, da hohe Laserintensitäten benötigt werden und nach einigen Sekunden bereits starke Bleichvorgänge auftreten (Ha *et al.*, 1996).

1.6.2 FRAP

Fluorescence recovery after Photobleaching (FRAP) ist eine Methode, die vor etwa 40 Jahren entwickelt wurde, um die laterale Mobilität und Dynamik fluoreszenzmarkierter Proteine zu untersuchen (Edidin *et al.*, 1976). In FRAP-Experimenten werden fluoreszierende Moleküle in einem kleinen Bereich einer Zelle mit Hilfe eines starken Laserlichtstrahls irreversibel geblichen. Anschließend wird die Wiederkehr der Fluoreszenz in den geblichenen Bereich, die in unbehandelten Zellen hauptsächlich durch Diffusionsvorgänge zustande kommt, bei niedriger Laserintensität erfasst (Reits und Neefjes, 2001). Aus FRAP-Experimenten kann man sowohl den Anteil als auch die Geschwindigkeit der mobilen Fraktion eines Proteins bestimmen. Interagiert das untersuchte Protein mit anderen Proteinen, so kann dies in einer Reduktion und Verlangsamung der mobilen Fraktion resultieren. Darüber hinaus kann die mobile Fraktion auch durch Membranbarrieren beeinträchtigt sein (Reits und Neefjes, 2001). Hierbei spielt es eine Rolle, in welcher Weise das untersuchte Protein mit der Membran in Kontakt tritt. So konnten für Proteine, welche über einen Lipidanker mit der Membran interagieren, schnellere Diffusionsraten gezeigt werden als für Transmembranproteine (Kenworthy *et al.*, 2004).

Vernachlässigt man aktive Transportvorgänge von Proteinen, so unterliegt die Mobilität von Proteinen hauptsächlich der Brownschen Molekularbewegung. Die uneingeschränkte

Diffusion eines Moleküls kann durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben werden (Arrio-Dupont *et al.*, 1997; Reits und Neefjes, 2001).

$$D = \kappa T / 6\pi\eta R_h$$

D: Diffusionskonstante

κ : Boltzmannkonstante

T: Temperatur

η : Viskosität

R_h : hydrodynamischer Radius des Partikels/Proteins

Vor allem der hydrodynamische Radius eines Proteins und die Viskosität der Umgebungslösung bestimmen die Diffusionsgeschwindigkeit. Darüber hinaus spielen auch spezifische Interaktionen und Kollisionen mit mobilen oder immobilen Hindernissen eine Rolle, (Reits und Neefjes, 2001). FRAP wird zur Bestimmung von Diffusionsgeschwindigkeiten und auch zur Untersuchung der Dynamik und des Ausmaßes von Protein-Proteininteraktionen eingesetzt. So konnte mittels FRAP gezeigt werden, dass Gas und G $\beta\gamma$ durch Rezeptorstimulation im Gegensatz Gi und G $\beta\gamma$ stabile Komplexe bilden (Digby *et al.*, 2006). Ferner wurde mittels Zweifarben-FRAP die Dynamik der Rezeptordimerisierung untersucht. Hierbei wurde ein Rezeptor, der einen extrazellulären CFP-Fluorophor hat, zusammen mit einem anderen Rezeptor exprimiert, der einen intrazellulären YFP-Fluorophor aufweist. Der Rezeptor mit dem extrazellulären Fluorophor wird durch einen Antikörper immobilisiert, sodass seine Lateralmobilität stark eingeschränkt ist. Interagieren die beiden Rezeptoren miteinander, so wird die Mobilität des zweiten, intrazellulär markierten Rezeptors durch die Anwesenheit des ersten Rezeptors limitiert (Dorsch *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden basierend auf den Vorarbeiten von Dorsch *et al.*, 2009, Zweifarben-FRAP-Messungen durchgeführt. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit erweitert und zur Untersuchung der Interaktionsstärke von aktivierten Rezeptoren mit Arrestin-3 eingesetzt. Hierbei wurden das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Arrestin-3-Wiederkehr an verschiedene Varianten des PTH- und β_2 -adrenergen Rezeptors untersucht.

1.7 Analyse der posttranslationalen Phosphorylierung

Die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren eines Proteins hat bedeutenden Einfluss auf seine Funktion. Das Anknüpfen eines Phosphatrests geschieht enzymatisch durch

Kinasen, während Phosphatasen für die Dephosphorylierung zuständig sind. Häufig dient die Phosphorylierung als ein molekularer Schalter, welcher die Aktivität eines Proteins z. B. bei der Zellteilung oder in der Signaltransduktion reguliert (Sickmann und Meyer, 2001). Bisher sind vier verschiedene Verknüpfungen in Phosphoamino-säuren bekannt, welche sich in Funktion und Stabilität unterscheiden (Martensen, 1984; Attwood *et al.*, 2011; Lorocho *et al.*, 2013; Buchowiecka, 2014):

O-Phosphate (Phosphorylierung an OH-Gruppen, von Serin, Threonin und Tyrosin)

N-Phosphate (Phosphorylierung an Aminogruppen von Arginin, Lysin und Histidin)

S-Phosphate (Phosphorylierung an Thiolgruppen von Cystein)

Acylphosphate (Bildung von Phosphoanhydriden mit Asparaginsäure und Glutaminsäure)

Am häufigsten kommt die O-Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, aber auch Tyrosinresten vor. Enzymaktivitäten werden häufig durch Serin- und Threoninphosphorylierung reguliert, während die Tyrosinphosphorylierung eine Rolle in der durch Hormone und Wachstumsfaktoren ausgelösten Signaltransduktion spielt (Buchowiecka, 2014). Als Phosphatgruppendonor dienen meist ATP oder andere Nucleosidtriphosphate, deren γ -Phosphate gerichtet übertragen werden können. Bei der Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindungen in ATP wird freie Enthalpie freigesetzt, weshalb ATP ein hohes Gruppenübertragungspotential besitzt. Dennoch sind ATP und andere Triphosphate kinetisch stabil, die Übertragung erfolgt enzymkatalysiert. Durch Phosphorylierung werden zwei zusätzliche negative Ladungen auf das Akzeptorprotein übertragen. Dies verändert die elektrostatischen Eigenschaften eines Proteins und kann zu Konformationsänderungen und Änderungen der Bindungseigenschaften eines Proteins führen (Johnson und O'Reilly, 1996).

1.7.1 RIPA

Die Analyse der posttranslationalen Phosphorylierung kann in Zellen und Geweben (*in vivo*) oder an gereinigten Proteinen und Kinasen (*in vitro*) vorgenommen werden. Zur Analyse der Phosphorylierung eines Proteins eignet sich ein Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA). RIPAs wurden ursprünglich 1977 von Brugge und Erikson an ^{35}S markierten Hühnerzellen entwickelt (Brugge und Erikson, 1977). Zur Analyse der totalen Phosphorylierung eines GPCRs *in vivo* erfolgt die metabolische Markierung lebender Zellen mit ^{32}P . Nach Stimulation mit einem geeigneten Liganden erfolgt die Lyse der Zellen. Damit die phosphorylierten Rezeptoren von anderen phosphorylierten Peptiden separiert werden können, werden sie mit einem Epitopmarker

versehen und durch Bindung an Antikörper gegen den Epitopmarker spezifisch angereichert. Durch mehrere Waschschr tte muss unspezifisch gebundenes ^{32}P entfernt werden, dann erfolgt die Auftrennung über SDS-PAGE und die β -Strahlung wird mittels Autoradiographie detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die totale Phosphorylierung an verschiedenen Rezeptoren, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, untersucht.

1.7.2 2D-Phosphopeptidmapping

Um die relative St ichiometrie der Phosphorylierung an unterschiedlichen Stellen eines Proteins zu bestimmen, kann 2D-Phosphopeptidmapping durchgeführt werden. Dazu werden mit ^{32}P markierte Peptide aus einem SDS-Gel extrahiert, proteolytisch verdaut, und in zwei Dimensionen dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Phosphopeptide werden autoradiographisch visualisiert und informieren über die Stärke der Phosphorylierung an bestimmten Stellen im Protein (Meisenhelder *et al.*, 2001).

1.7.3 Phosphospezifische Antikörper

Durch Immunisierung mit synthetischen Phosphopeptiden können phosphospezifische Antikörper hergestellt werden. Die phosphorylierten Proteine können dann nach Auftrennung per SDS-PAGE einer Western-Blot-Analyse unterzogen werden oder in Immunfluoreszenzen zum Einsatz kommen (Murray *et al.*, 2013).

1.7.4 Phosphoproteomik

Die immunchemische oder radioaktive Detektion der Phosphorylierung liefert hauptsächlich qualitative Informationen. Massenspektrometrische Methoden mittels MALDI-oder ESI-MS hingegen geben Hinweise auf die Anzahl sowie die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung eines Peptids erhöht seine Masse um + 80 Da, daher können eine oder mehrere Phosphorylierungsstellen durch Vergleich der tatsächlichen mit der theoretischen Masse des Peptids ermittelt werden. Für die Probenaufbereitung zur Bestimmung phosphorylierter GPCR werden zunächst Zellmembranen präpariert und lysiert. Native oder epitopmarkierte, überexprimierte Rezeptoren werden dann mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und per SDS-PAGE separiert. Das SDS-Gel wird dann einer Proteinfärbung unterzogen und die Bande von Interesse wird ausgeschnitten. Dann erfolgen die Reduktion von

Disulfidbrücken z.B. durch DTT und die Alkylierung von SH-Gruppen z.B. durch Iodoacetamid, um die Reassoziaton zu Disulfidbrücken zu vermeiden (López-Ferrer *et al.*, 2006; Hustoft *et al.*, 2010). Um Peptide zu erhalten, erfolgt meist ein tryptischer Verdau (Worthington *et al.*, 2011) gefolgt von der Extraktion aus dem Gel und einer spezifischen Anreicherung der Phosphopeptide, um phosphorylierte und nicht phosphorylierte Peptide voneinander zu trennen. Dies geschieht durch Ionen-Metall-Affinitätschromatographie (IMAC), bei der man sich zunutze macht, dass Phosphopeptide z.B. an Eisenionen, die an Iminodiacetat-Agarosegelen immobilisiert sind, binden (Andersson und Porath, 1986). Der Nachteil hierbei ist, dass neben phosphorylierten Peptiden auch andere saure Peptide einen Komplex mit Eisenionen bilden können. Komplextiert man dagegen mit TiO_2 so kann man bei saureren pH-Werten arbeiten, jedoch können mehrfach phosphorylierte Peptide mit dieser Methode nur schwer eluiert werden (Rosenqvist *et al.*, 2011).

1.7.4.1 Lokalisation von Phosphorylierungsstellen durch massenspektrometrische Fragmentionenanalyse

Die massenspektrometrische Sequenzierung von Phosphopeptiden erfolgt meist durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) mit Triplequadrupolmassenspektrometern. Diese bestehen aus vier Quadrupolen Q0-Q3, die durch Wechsel- und Gleichspannungsfelder nur Ionen mit einem bestimmten m/z Verhältnis passieren lassen. Die durch Elektronensprayionisation (ESI) oder „fast atom bombardement“ generierten Peptidionen werden in Q0 fokussiert. In Q1 werden die Ionen gescannt und in Q2 durch Kollision mit Stickstoff, Helium- oder Argongas fragmentiert (CID collision induced dissociation). Q3 bildet neben Q1 den zweiten Messquadrupol, dort wird die Masse der Fragmentionen durch die Kopplung an einen Sekundärelektronenvervielfacher bestimmt (De Hoffmann, 1996). Aus den durch CID fragmentierten Peptidionen erhält man eine Reihe von y-Ionen und b-Ionen. y-Ionen resultieren aus der Spaltung einer Peptidbindung auf der c-terminalen Seite während b-Ionen aus der Spaltung einer Peptidbindung von n-terminaler Seite generiert werden. Hohe Kollisionsenergien können auch zu Spaltungen in Aminosäureseitenketten führen (Biemann, 1988). Phosphorylierte Serine und Threonine sind instabil und die klassische kollisionsinduzierte Dissoziation führt häufig zum Verlust von Phosphorsäure (H_3PO_4 , -98 Da), aufgrund der in der Gasphase stattfindenden β -Elimination der Phosphoesterbindung. Da ein Teil der Kollisionsenergie für die Spaltung der Seitenketten oder die Abspaltung von Phosphaten verloren geht, werden Peptide häufig nur unzureichend fragmentiert, wodurch die Lokalisation phosphorylierter Stellen oft

erschwert ist (Thingholm *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden Phosphorylierungsstellen des β 2-adrenergen und des PTH-Rezeptors untersucht (s. Kapitel 3.1, 3.2).

Zielsetzung

Die Phosphorylierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren stellt ein Schlüsselereignis bei der Regulation der Rezeptorfunktion dar und bestimmt die nachfolgenden Signalwege dieser Rezeptorfamilie. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Dynamik von Arrestin-Rezeptorkomplexen in Abhängigkeit der Rezeptorphosphorylierung zu untersuchen. Dazu sollten sowohl Modifikationen auf Rezeptorebene, als auch auf Arrestinebene vorgenommen werden und funktionelle Konsequenzen dieser Modifikationen untersucht werden.

Es ist bekannt, dass die Entfernung von Phosphorylierungsstellen im proximalen C-Terminus des $\beta 2AR$ zum Verlust der Interaktion mit Arrestinen führt (Krasel *et al.*, 2008). Bisher ist jedoch nicht geklärt, wie sich das Einfügen zusätzlicher Phosphorylierungsstellen in einen Rezeptor auf die Interaktion mit Arrestinen und nachgeschaltete Signalwege auswirkt. Einige Rezeptoren, wie z. B. der V2R weisen im proximalen C-Terminus Serin- und Threonincluster als potentielle Phosphorylierungsstellen auf. Es gibt Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung dieser Cluster zur hochaffinen Interaktion mit Arrestin führt (Oakley *et al.*, 1999). Im ersten Teil dieser Arbeit gab es daher folgende Fragen zu beantworten: Kann ein zusätzlicher in einen Rezeptor eingebrachter Serincluster agonistabhängig phosphoryliert werden? Kann ein Rezeptor, der Arrestin normalerweise mit geringer Affinität bindet, durch zusätzliche Phosphorylierungsstellen stärker mit Arrestin interagieren? Wird der Arrestin-Transport durch zusätzliche Phosphorylierungsstellen im Rezeptor beeinflusst? Wie wirken sich zusätzliche Phosphorylierungsstellen auf die Interaktion mit G-Proteinen und die Rezeptorinternalisierung aus?

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit hatte zum Ziel, ligandenabhängige Phosphorylierungsstellen des humanen PTH1-Rezeptors zu identifizieren. In Studien an Ratten- oder Opossum-PTH-Rezeptoren wurde gezeigt, dass der PTHR agonistabhängig phosphoryliert wird (Blind *et al.*, 1995, 1996; Malecz *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1998; Tawfeek *et al.*, 2002). In diesen Studien wurden durch Radioimmunpräzipitationsassays hauptsächlich quantitative Aussagen zur Rezeptorphosphorylierung getroffen. Durch 2D-Phosphopeptidmapping konnte am Opossum-PTHR gezeigt werden, dass mindestens sechs Serinreste im C-Terminus agonistabhängig phosphoryliert werden (Tawfeek *et al.*, 2002).

Ein Ziel dieser Arbeit war, die genaue Lokalisation der ligandenabhängigen Phosphorylierungsstellen des humanen PTH1-Rezeptors erstmals mittels MS/MS zu untersuchen. Nach der Identifikation und Quantifizierung ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen im PTHR-C-Terminus stand die funktionelle Charakterisierung dieser Stellen im Fokus. Dazu sollte der Einfluss proximaler und distaler Phosphorylierungsstellen auf die Interaktion mit Arrestin untersucht werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde angestrebt, die Auswirkungen zweier konservativer Mutationen (K11,12R) in β -Faltblatt1 in Arrestin-3 auf die Affinität zu einer Klasse-A und verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren zu untersuchen. Eine zuvor publizierte Studie konnte zeigen, dass diese Mutation die Ubiquitinierung von Arrestin verringert (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob Arrestin-3 K11,12R unterschiedliche Phosphorylierungszustände G-Protein gekoppelter Rezeptoren in gleicher Weise erkennt wie Wildtyp-Arrestin-3.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Lieferant
Deckgläschen (25 mm, rund)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (6 ml)	Neolab, Heidelberg
Eppendorfgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Protein LoBind Eppendorfgefäße	Eppendorf, Berzdorf
Kulturröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR, Darmstadt
Petrischalen (10 cm)	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen (2 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
PVDF Membranen	Roche, Mannheim
6-Well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnberg
Whatmanpaper	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen (15 cm, 10 cm, 6 cm)	Sarstedt, Nürnberg

Tabelle 2.2: Allgemeine Reagenzien

Substanz	Lieferant
Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Aktivkohle	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose (LE)	Biochrom, Berlin
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim

Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	New England BioLabs, Frankfurt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL-Lösung (Cheluminat-HRP PicoDetect)	Applichem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immersionsöl (Immersol 518F)	Zeiss, Jena
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
(-)-Isoproterenolhydrochlorid	Sigma-Aldrich Steinheim
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
KapaHifi DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen
LB-Medium nach Lennox	Applichem, Darmstadt
1 kb Leiter	New England BioLabs, Frankfurt
T4 Ligase	New England BioLabs, Frankfurt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Lenz-Chemie, Westerbürg
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfate (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
[³² P] Orthophosphat	Perkin Elmer, Billerica MA
PEG 3000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific, Langenselbold

Pfu DNA Polymerase	Thermo Scientific, Langenselbold
Phos-Stop Phosphataseinhibitoren	Roche, Mannheim
Proteaseinhibitor-Mix (cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack)	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt
RNaseA	Roche, Mannheim
Salzsäure (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Plasmide

Tabelle 2.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten cDNA Konstrukte

Plasmid	Ursprung
Flag-β2AR-YFP	(Krasel <i>et al.</i> , 2005)
β2AR-CFP	(Krasel <i>et al.</i> , 2005)
β2-V2R-YFP	(Oakley <i>et al.</i> , 1999)
Arrestin-3-CFP	(Krasel <i>et al.</i> , 2005)
Flag-β2AR-YFP SSS	kloniert von Suleiman Al-Sabah (Zindel <i>et al.</i> , 2015)
Flag β2AR SSS	diese Arbeit
Flag-β2AR-YFP AAA	diese Arbeit
Flag-β2AR AAA	diese Arbeit
Flag-β2AR PD	diese Arbeit
β2AR-YFP pd	(Bouvier <i>et al.</i> , 1988)
β2AR-YFP 5S	diese Arbeit
β2AR-YFP 3S	diese Arbeit
β2AR-YFP 2S	diese Arbeit
Flag-β2AR 5S	diese Arbeit
Flag-β2AR 3S	diese Arbeit

Flag-β2AR 2S	diese Arbeit
Flag-β2AR-YFP SSS distal	diese Arbeit
GRK 2	(Winstel <i>et al.</i> , 1996)
Gβ1-Cer	(Frank <i>et al.</i> , 2005)
Gas	(Hein <i>et al.</i> , 2006)
Gγ2	(Lutz <i>et al.</i> , 2005)
YFP- β2AR	(Dorsch <i>et al.</i> , 2009)
YFP- β2AR SSS	diese Arbeit
YFP- β2V2R	diese Arbeit
mcherry-EEA1	Cornelius Krasel (Zindel <i>et al.</i> , 2015)
Ubiquitin-YFP	diese Arbeit
Ubiquitin-YFP mit Linkerpeptid	diese Arbeit
YFP-Arrestin-3-Ubiquitin	Cornelius Krasel
Arrestin-3-CFP K11,12R	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP S473A, S475A	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP PD1	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP PD2	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP PD3	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP PD3, S519A	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP PD5	diese Arbeit
HA-PTHR-YFP T503A, S504A	diese Arbeit
HA-PTHR	diese Arbeit
HA-PTHR PD1	diese Arbeit
HA-PTHR PD2	diese Arbeit
HA-PTHR PD3	diese Arbeit
CFP-DOR-YFP	Sandra Dorsch

2.1.3 Eukaryotische und prokaryotische Zelllinien

Zur Plasmidamplifikation wurden chemisch kompetente *E.coli* DH5a verwendet. Alle transient transfizierten Experimente wurden in HEK293T-Zellen („human embryonic kidney cells“) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine adhäre Nierenepithelzelle, die aus menschlichen Embryonen gewonnen wurde und mit Abschnitten des menschlichen Adenovirus 5 immortalisiert wurde. Darüber hinaus wird in HEK293 TSA Zellen das Protoonkogen SV40 large T-Antigen exprimiert, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40-Origin ermöglicht. Zur Generation stabiler Zelllinien ist es essentiell HEK 293 Zellen zu verwenden welche das large T-Antigen nicht exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf stabile Zelllinien in HEK293 Zellen generiert. Die stabilen Zelllinien exprimieren: Flag-β2AR, Flag-β2AR SSS, Flag-β2AR AAA, Flag-β2AR PD oder HA-PTHR1. Es wurde jeweils 1 µg DNA des Rezeptors in ca. 30-50 % konfluent gewachsene HEK 293 Zellen in Ø 6 cm Zellkulturschalen transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h nach der Transfektion 1:100 auf Ø 15 cm Schalen gesplittet und mit 1 mg/ml G418 selektioniert. Nach etwa 1-2 Wochen wurden einzelne Zellpopulationen gepickt und auf die Rezeptorexpression mittels Immunfluoreszenz überprüft. Die Rezeptordichte wurde für die β2-adrenergen Rezeptoren durch Ligandenbindungsassays nach Passage eins, sechs und zwölf bestimmt. Die Zelllinien, welche den Rezeptor dauerhaft stabil exprimierten, wurden mit 600 µg/ml G418 weiterkultiviert und für Experimente herangezogen. G418-haltiges DMEM wurde vor jedem Splitvorgang frisch angesetzt.

Tabelle 2.4: Reagenzien für die eukaryote Zellkultur

Substanz	Lieferant
DMEM (high glucose)	Biochrom, Berlin
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
L-Gutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/ EDTA (1:250)	Biochrom, Berlin

2.1.4 Primer

Alle Primer wurden bei Eurofins Genomics in Ebersberg bestellt. Dort werden Oligonucleotide mit Hilfe von Phosphoramidit an fester Phase synthetisiert. Die Oligonucleotide wurden mit Wasser auf eine finale Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt und zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, zum Anhängen von Schnittstellen oder zur zielgerichteten Mutagenese eingesetzt.

2.1.4.1 Primer zur zielgerichteten Mutagenese

Tabelle 2.5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer

Name	Sequenz	Mutation
β 2AR SSS fw β 2AR SSS rev	5'GCTACTCCAGCAACGGCAACACAAGCTCGTCG AGTGGATATCACGTGGAACAGG 3' 5'CCTGTTCCACGTGATATCCACTCGACGAGCTTG TGTTGCCGTTGCTGGAGTAGC 3'	Mutation von GEQ 361-363 zu SSS im β 2AR
β 2AR AAA fw β 2AR AAA rev	5'GCAACGGCAACACAGCCGCTGCAAGTGGATAT CACGT 3' 5'ACGTGATATCCACTTGCAGCGGCTGTGTTGCCG TTGC 3'	Mutation von GEQ 361-363 zu AAA im β 2AR
SSS distal fw SSS distal rev	5'ACTGTGCCTAGCGATAGCAGTTCTTCACAAGGG AGGAAT 3' 5'ATTCCTCCCTTGTGAAGAACTGCTATCGCTAGG CACAGT3'	Mutagenese von N398, I399 und D400 im β 2AR zu S
S355/356 fw S355/356 rev	5'TATGGGAATGGCTACTCTTCAAACGGCAACGCA GGG 3' 5'CCCTGCGTTGCCGTTTGAAGAGTAGCCATTCCC ATA 3'	Reintegration von Ser 355, Ser 356 in β 2AR PD
S355/356 SSS fw S355/356 SSS rev	5'GGGAATGGCTACTCTTCAAACGGCAACGCATCT TCATCTGGTGGATATCAC 3' 5'GTGATATCCACCAGATGAAGATGCGTTGCCGTT TGAAGAGTAGCCATTCCC 3'	Reintegration von Ser 355, Ser und 356Austausch von GEQ 361- 163 zu SSS im β 2 AR pd
SSS fw	5'GGAAACGGCAACGCATCTTCATCTGGTGGATAT CACGTG 3'	Mutation von GEQ 361-363 zu

SSS rev	5' CACGTGATATCCACCAGATGAAGATGCGTTGCC GTTTCC 3'	SSS im β 2AR PD
K11,12R fw	5' GGA CCAGGG TCT TCC GCC GAT CGA GTC CTA ACT G 3'	Mutation von K11, K12 zu R in Arrestin-3
K11,12R rev	5' CAGTTA GGA CTC GAT CGG CGG AAG ACC CTG GTC C 3'	
AGAAAYA fw	5' GACTTCAAGCGAAAGGCACGCGCCGGGGCTGC TGCATATGCCTACGGCCCCATGGTGTCCAC 3'	Mutation von S489,S491-493,4 95 im hPTHR1 zu A
AGAAAYA rev	5' GTGGGACACCATGGGGCCGTAGGCATATGCAG CAGCCCCGGCGCGTGCCTTTC GCTTGAAGTC 3'	
AHAAVA fw	5' TACGGCCCCATGGTGGCTCACGCAGCTGTGGCC AATGTCGGCCCCCGT 3'	Mutation von S501,T503, S504, T506 im hPTHR1 zu A
AHAAVA rev	5' ACGGGGGCCGACATTGGCCACAGCTGCGTGAG CCACCATGGGGCCGTA 3'	
S519A fw	5' GGCCTGCCCCTCGCACCCCGCCTACTG 3'	Mutation von S519 im hPTHR1 zu A
S519A rev	5' CAGTAGGCGGGGTGCGAGGGGCAGGCC 3'	
AWA fw	5' GAGATCAAGAAAGCATGGGCTCGCTGGACACT G 3'	Mutation von S473, S475 im hPTHR1 zu A
AWA rev	5' CAGTGTCCAGCGAGCCCATGCTTTCTTGATCTC 3'	
AAA fw	5' CCCC GCCTACTGCCCGCTGCCGCCGCAACGGC CACCTCAG 3'	Mutation von T525, T527, T528 im hPTHR1 zu A
AAA rev	5' CTGAGGGTGGCCGTTGGCGGCGGCAGCGGGCA GTAGGCGGGG 3'	
APALEALEAA fw	5' CATGCCAAGCCAGGGGCCCCAGCCCTGGAGGC CCTCGAGGCCGCACCACCTGCCATGGCT 3'	Mutation von T542, T547, T550, T551 im hPTHR1 zu A
APALEALEAA rev	5' AGCCATGGCAGGTGGTGC GGCCTCGAGGGCCT CCAGGGCTGGGGCCCCCTGGCTTGGCATG3'	
ACA fw	5' TTCCTCAACGGCGCTTGCGCAGGCCTGGACGAG 3'	Mutation von S577, S579 im hPTHR1 zu A
ACA rev	5' CTCGTCCAGGCCTGCGCAAGCGCCGTTGAGGA A 3'	

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Bestellnummer	Firma	Verdünnung
GFP/CFP/YFP	Ziege	600-101-215	Rockland, Gilbertsville	1:100 (FRAP)
HA.11 (16B12)	Maus	1DB-001-0001899618	Covance	1:100 (FRAP) 1:1000 (WB)
FLAG	Maus	F3165	Sigma Aldrich, Steinheim	1:1000 (WB)
FLAG	Hase		Sigma Aldrich, Steinheim	1:1000 (WB)
GRK2	Hase	Sc-562	Santa Cruz, Biotechnology Heidelberg	1:1000 (WB)

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Bestellnummer	Firma	Verdünnung
Ziege	Pferd	PI-9500	Vector Laboratories, Burlingame	1:2000
Maus	Pferd	7076	Cell Signaling, Darmstadt	1:2000
Hase	Ziege	7074	Cell Signaling, Darmstadt	1:2000

2.1.6 Liganden

Peptidliganden	
hPTH 1-34	Bachem, Bubendorf, Schweiz
D-Trp ¹² , Tyr ³⁴ bPTH 7-34	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Radioliganden	
[³ H] CGP 12,177	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³ H] Dihydroalprenolol	Hartmann Analytic, Braunschweig
sonstige Liganden	
(-)-Isoproterenolhydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
(-)-Epinephrin(+)-bitartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung werden Zellen bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurde das Zellpellet einer konfluenten 10 cm-Schale in 800 µl DMEM Vollmedium resuspendiert, zusätzlich wurden 100 µl FCS sowie 100 µl DMSO hinzugefügt und die Suspension in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde dann für mindestens 80 min in einer Cool Cell® Einfrierbox, welche einen Temperaturabfall von -1°C / min gewährleistet, bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmten DMEM Vollmedium resuspendiert und 1,5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem DMEM resuspendiert und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt. Nach etwa 5-6 h wurden nicht adhärente Zellen durch einen Medienwechsel entfernt.

DMEM Vollmedium

DMEM mit Glucose (4,5 g/l)	89 %
FCS	8,9 %
L-Glutamin	0,89 %
Penicillin (100 E/ml) / Streptomycin (0,1 mg/ml)	0,89 %

2.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM Vollmedium bei 37°C und 5 % CO₂. Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit Trypsin /EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes unter Sichtkontrolle abgelöst. Nach etwa 30 s wurde der Vorgang durch Zugabe eines Überschusses an Vollmedium, welches FCS und somit Antitrypsin enthält, gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 1,5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Zellpellet in DMEM Vollmedium resuspendiert. Je nach gewünschter Zelldichte wurde ein entsprechender Teil in ein frisches Zellkulturgefäß mit Medium überführt. Je nach Bedarf erfolgte das Passagieren der Zellen im 1-3 Tagesrhythmus dementsprechend lag das Teilungsverhältnis zwischen 1:2 bis 1:8.

2.2.1.3 Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene®

Bei einer transienten Transfektion wird Fremd-DNA in den Zell-Kern eingeschleust. Da keine Integration ins Chromosom erfolgt, geht die Expression der gewünschten Proteine mit der Mitose wieder verloren. Bei Effectene® handelt es sich um ein nicht liposomales, lipidhaltiges Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit Enhancer® eingesetzt wird. In einem 5-minütigen Inkubationsschritt wird die DNA durch Interaktion mit Enhancer® in einem definierten Puffersystem kondensiert. Durch Zugabe von Effectene können nach einem 7-minütigen Inkubationsschritt kondensierte DNA-Effectene-Komplexe von den Zellen aufgenommen werden. 12-48 h vor der Transfektion wurden Zellen so ausgesät, dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 40 % herrschte. Für eine 6 cm Schale wurden je nach Experiment 1-3 µg DNA in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 200µl EB-Puffer vermischt und wie oben beschrieben mit Enhancer® und Effectene® inkubiert. Die vom Hersteller empfohlenen Mengenangaben 8 µl Enhancer® und 10 µl Effectene® pro 1 µg DNA wurden eingehalten. Das Gemisch aus DNA, Puffer, Enhancer® und Effectene® wurde dann auf die Zellen getropft. Nach einer

Inkubationszeit von 16-24 h bei 5 % CO₂ und 37°C wurden die Zellen auf Deckgläschen oder andere Trägermedien gesplittet und 40-48 h nach der Transfektion für Experimente verwendet.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Um die Anzahl von Zellen pro ml Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zählfläche besteht aus einer Glasplatte mit einer 0.1 mm starken Vertiefung. Die Zählfläche ist mit einem Liniennetz ausgestattet, welches aus 3x3 Großquadraten besteht, wovon 4 in jeweils 16 Unterquadrate à 0.25 mm Kantenlänge unterteilt sind. Auf die Zählfläche wird ein Deckgläschen aufgebracht. 20 µl Zellsuspension werden an die Grenzfläche zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert und durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gezogen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 3x16 Unterquadrate unter lichtmikroskopischer Betrachtung ausgezählt und der Mittelwert mit einem kammer-spezifischen Faktor 1000 multipliziert, um die Zellzahl in 100 µl Zellsuspension zu erhalten.

2.2.1.5 Passagieren von Zellen auf Deckgläschen

Um die Zelladhäsion auf Deckgläschen durch Reduktion der Oberflächenspannung zu verbessern, wurden diese vor dem Aussäen der Zellen mit PLL (Poly-L-Lysin 1 mg/ml) beschichtet. Dazu wurden die Deckgläschen zunächst in Ethanol 70 % sterilisiert, dann in PBS gewaschen und maximal 20 min mit 50 µl PLL inkubiert. Nach Absaugen und mehrmaligem Waschen mit PBS wurden transfizierte Zellen wie unter 2.2.1.2 beschrieben auf die Deckgläschen ausgesät.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) stellt eine Methode zur exponentiellen, enzymatischen in vitro DNA-Amplifikation dar (Mullis *et al.*, 1986). Mit Hilfe einer PCR können auch gezielt Restriktionsschnittstellen zum Klonieren oder Mutationen zur Analyse der Funktionsweise eines Proteins in die DNA eingefügt werden.

Ein üblicher PCR-Ansatz enthält folgende Bestandteile:

50-100 ng Template

0,5 µl Primer vorwärts (100 pmol/µl)

0,5 µl Primer rückwärts (100 pmol/µl)

5 µl Polymerasepuffer (10 x)

10 µl Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10mM)

1 µl Phusion-Polymerase oder KaPa HiFi Polymerase

ad 50 µl H₂O

Das Template dient als DNA-Matrize und enthält die DNA-Sequenz, die amplifiziert, mutiert oder mit Restriktionsschnittstellen versehen werden soll. Die Primer bilden zum Einzelstrang-Template komplementäre Bereiche und sind etwa 15-20 Basenpaare (bp) lange Oligonucleotide, welche den Startpunkt der DNA-Vervielfältigung markieren und gleichzeitig den zu vervielfältigenden Bereich begrenzen. Ist die Insertion einer Mutation oder das Anhängen einer Restriktionsschnittstelle gewünscht, so wird diese in den Primer eingefügt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt enzymatisch mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase. Das optimale Milieu für die Polymerase wird durch den Polymerasepuffer bestimmt, welcher unter anderem MgCl₂ enthält, da Mg²⁺ als Co-Faktor thermostabiler Polymerasen fungiert. Im ersten PCR-Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 98°C, hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und die DNA liegt nach diesem Schritt nicht mehr als Doppelhelix, sondern in Einzelsträngen vor, sodass bei 50-60°C die Anlagerung (annealing) der Primer stattfinden kann. Die ideale Annealingtemperatur ist abhängig von der Länge und der Sequenz der Primer. Im nachfolgenden Schritt, dem Elongationsschritt, werden die Desoxyribonukleotidtriphosphate an die Oligonucleotide vom 5' zum 3' Ende hin mit Hilfe der Polymerase durch Veresterung angeknüpft. Die einzelsträngige DNA dient hierbei als Matrize, die Dauer des Elongationsschrittes hängt von der Länge des Matrizenstranges und von der Elongationsgeschwindigkeit der Polymerase ab. Die Elongationstemperatur variiert je nach Enzym zwischen 68-72°C, die Elongationsgeschwindigkeit der in dieser Arbeit verwendeten verwendeten Phusion- oder Kapa HiFi Polymerase liegt bei 15 s/kbp. Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden zyklisch 18-30-mal wiederholt. Die Phusion-Polymerase ist mit einer pyrococcusartigen Polymerase fusioniert, welche über eine Korrekturlesefunktion verfügt. Durch die Korrekturlesefunktion werden

falsch eingefügte Nukleotide erkannt und entfernt. Diese Polymerase ist somit sowohl für eine schnelle als auch sequenzexakte DNA-Amplifikation gut geeignet.

PCR Zyklus:

Schritt	Temperatur °C	Dauer
Denaturierung	98	3 min
Denaturierung	98	30 s
Annealing	50-65	30 s
Elongation	72	(15 s/kbp)
Elongation	72	3 min
Kühlen	4	∞

2.2.2.2 Mutagenese

Um den gezielten Austausch von einzelnen Aminosäuren oder Aminosäureclustern auf DNA-Ebene durchzuführen, wurde das QuikChange[®] Protokoll von Stratagene optimiert. Es wurden Vorwärts-und-rückwärts-Primer mit einer Länge von 30-65 Basen entworfen, welche die gewünschte Mutation enthielten, ansonsten aber komplementär zur Sequenz des Ausgangsplasmids waren. Nach der PCR, welche wie unter 2.2.1.1 beschrieben durchgeführt wurde, erfolgte eine Ethanolfällung. Dazu wurde der PCR Ansatz in 1 ml reinen EtOH pipettiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das evtl. sichtbare DNA-Pellet in 17 µl entionisiertem Wasser resuspendiert, mit 2 µl NEB Puffer 4 (Smart Cut) und 1 µl DpnI-Enzym versetzt und mindestens 70 min bei 37°C inkubiert. Hierbei wird das in Bakterien amplifizierte methylierte Template verdaut und vom nicht methylierten PCR Produkt getrennt. Dann erfolgte die Transformation in E.coli (DH5α), um die Plasmidringe zu schließen und zu vervielfältigen.

2.2.2.3 Restriktionsverdau

Um Ziel-DNA (insert) in einen Vektor zu integrieren, müssen beide entsprechende freie 5' und 3' Enden besitzen. Dies wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen erreicht, welche meist Palindromsequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spezifisch schneiden. Idealerweise wählt man zwei verschiedene Schnittstellen für den Vektor und die Enden des Inserts, um die korrekte Richtung des Einbaus sicherzustellen.

Beispiel für einen Restriktionsverdau-Ansatz

3 µl DNA (3µg)
2 µl Reaktionspuffer (10x)
0.2 µl BSA
0.5-1 µl Restriktionsenzym(e) (4-50 U /ml)
H₂O ad 20 µl

Die Mengen an Restriktionsenzym und DNA können variieren, zu analytischen Zwecken reichen auch kleinere Mengen an DNA und Enzym aus, während zu präparativen Zwecken idealerweise 3 µg DNA eingesetzt werden. Der Einsatz von BSA, die Reaktionstemperatur sowie die Wahl des Reaktionspuffers sind vom Enzym abhängig und bei der Verwendung wurden die Angaben des Herstellers beachtet. Die Reaktionszeiten betrugen meist 1 h, ggf. länger bis zu 18 h. Die nachfolgende Analyse des Verdaus erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der gewonnenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Im elektrischen Spannungsfeld wandert durch Phosphatgruppen negativ geladene DNA in Richtung Anode. Gemäß den Gesetzmäßigkeiten der elektrophoretischen Mobilität bewegen sich kleine DNA-Fragmente schneller in Richtung Anode als große Fragmente, weshalb die Agarosegelelektrophorese in der Molekularbiologie zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, z.B. nach einem Restriktionsverdau dient. DNA-Fragmentlösungen, wie sie zum Beispiel beim Verdau mit Restriktionsenzymen entstehen, wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und für ca. 45 min bei konstanter Spannung (80V) in einer horizontalen Gelkammer aufgetrennt. Die Visualisierung der Fragmente erfolgte mit UV-Licht bei $\lambda=365$ nm, um die Visualisierung zu ermöglichen wurden dem Agarosegel 0,02 mg Ethidiumbromid zugesetzt. Um die Größe der Fragmente einschätzen zu können, wurde eine Spur mit einer DNA-Leiter, welche DNA-Fragmente bekannter Größe enthält, befüllt.

Agarose-Gel 1 %

Agarose	1 g
TAE-Puffer	99 g
Ethidiumbromid	20 µg

DNA-Ladepuffer 6fach konzentriert

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

60 mM EDTA

60 % Glycerin

0.03 % Xylencyanol

0.15 % Orange G

TAE-Puffer, pH 8,3

40 mM Tris

40 mM acetate

1 mM EDTA

2.2.2.5 DNA- Extraktion aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung konnten die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die DNA mittels Mikrofiltration (Ultrafree-DA Centrifugal Filter Unit, Merck Millipore) durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm abgetrennt.

2.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um freie 3'-OH-Enden mit freien 5'-PO₃⁻-Enden, wie sie nach einem Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA vorliegen, enzymatisch zu verknüpfen, wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Um Ziel-DNA (Insert) in einen Vektor zu ligieren, wurden die durch Mikrofiltration gewonnenen DNA-Fragmente entweder 1 h bei Raumtemperatur, über Nacht bei 16°C oder über ein Wochenende im Kühlschrank bei 4°C ligiert. Bei jeder Klonierung wurde eine Religationskontrolle pipettiert, welche Auskunft über das Ausmaß von nicht geschnittenem Vektor gibt. Hierbei wurde die Menge an Insert durch die gleiche Menge Wasser ersetzt.

Beispiel für einen typischen Ligationsansatz:

2 µl Vektor

6 µl Insert

2 µl Ligasepuffer

1 µl T4-Ligase (400 U/µl)

H₂O ad 20 µl

2.2.2.7 Kompetente *E. coli*

Da Bakterien Fremd-DNA nicht ohne weiteres aufnehmen, müssen sie, um Plasmide in ausreichender Menge zu amplifizieren, z.B. durch Ca^{2+} -Ionen modifiziert werden (Chung *et al.*, 1989). Dazu wurden 250 ml SOC mit 20 μl *E.coli* angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD) von 0,6 bei 600 nm erreicht war. Die Bakterien wurden dann 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 80 ml TB-Puffer resuspendiert. Es erfolgte ein erneuter 10-minütiger Kühlschritt mit anschließender Zentrifugation, wonach das Pellet dann in 20 ml TB-Puffer, (10 % (m/V) PEG 3000, 5 % (V/V) DMSO, 20 mM MgCl_2 in LB Medium) resuspendiert und in gewünschte Mengen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert wurde.

SOC-Medium, pH 7 sterilfiltriert

Pepton 2 %

Hefe-Extrakt 0.5 %

NaCl 10 mM

KCl 2.5 mM

MgCl_2 10 mM

MgSO_4 10 mM

Glucose 20 mM

2.2.2.8 Transformation in kompetente *E.coli*

Die Vervielfältigung der durch Ligation gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte in kompetenten *E. coli*. 100 μl kompetente *E.coli* wurden mit 5 μl des Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis gekühlt. Nach einem 10-minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurde erneut auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 800 μl LB-Medium 30 min bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde in 100 μl frischem LB resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf Agarplatten, die das dem Vektor entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB medium (lysogeny broth) pH 7, autoklaviert

NaCl 5 g

Pepton 10 g

Hefeextrakt 5 g

H₂O ad 1 l

2.2.2.9 Herstellung LB-Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin

Agar 1 % in LB medium

Nach dem Zusatz von 100 mg/ l Ampicillin-Na oder 30 mg/ l Kanamycinsulfat wurden die Platten bei einer geschätzten Temperatur von etwa 45°C gegossen.

2.2.2.10 Mini-Präparation

Die Minipräparation dient zur Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA und kam zu analytischen Zwecken wie z.B. der Überprüfung einer vorangegangenen Klonierung zum Einsatz. Die auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonien wurden gepickt, in ein Falconröhrchen mit 3 ml LB mit Antibiotikazusatz (Ampicillin-Na 100 mg/ l oder Kanamycinsulfat 30 mg/l) überführt und über Nacht ca. 16 h bei 37°C und ca. 150 rpm geschüttelt. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden dann in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zunächst in 100 µl Resuspensionspuffer P1 resuspendiert und anschließend mit 200 µl P2 vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 300 µl Neutralisationspuffer P3 hinzugefügt und nach gründlicher Durchmischung sowie einem 10-minütigen Kühlschritt auf Eis erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm. 600 µl des Überstands wurden mit 600 µl kaltem Isopropanol gründlich durchmischt und erneut 10 min bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 300 µl Ethanol 70 % gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst.

Resuspensionspuffer P1

Tris (pH 8) 50 mM

EDTA 10 mM

RNase A 100 µg/ml

Lyse Blue 1 µg/ ml

Lysepuffer P2

NaOH 200 mM

SDS 1 % (w/v)

Neutralisationspuffer P3 (pH 5)

Kaliumacetat 3 M

2.2.2.11 Midi-Präparation

Das Prinzip der Midipräparation läuft ähnlich ab wie bei der Minipräparation. Eine Kolonie wurde über Nacht in 100 ml LB mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin-Na 100 mg/l oder Kanamycinsulfat 30 mg/l) inkubiert. Die Midipräparation dient der Gewinnung von größeren Mengen DNA ($> 200 \mu\text{g}$) und liefert durch den Einsatz von kleinen Ionenaustauscher-Säulen gekoppelt an mehrere Waschschrte, reinere DNA als die Minipräparation. Zur Gewinnung von reiner Plasmid-DNA aus einer Midipräparation wurde ein Kit (Quiagen Plasmid Preparation Kit ®) verwendet und die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt.

2.2.2.12 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA die aus Mini-oder Midipräparationen gewonnen wurde, ist absorptionsphotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm und 320 nm mittels Nano Photometer bestimmt worden. Als Leerprobe diente entionisiertes Wasser, womit auch die DNA-Proben auf die gewünschte Konzentration eingestellt wurden.

2.2.2.13 Sequenzierung

Wurde ein DNA Fragment durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation in einen anderen Vektor eingebracht oder herausgeschnitten, so wurde die An-oder Abwesenheit des Fragments durch eine Minipräparation und nachfolgendem Kontrollverdau sichergestellt. Nach einer Mutagenese oder der Amplifikation eines DNA Fragments durch eine PCR wurde die Korrektheit der DNA-Sequenz durch Sequenzierung der Firma MWG Eurofins bestätigt. Hierbei wird die „Cycle Sequencing“- Methode nach Sanger eingesetzt. Es wird eine PCR mit einem geeigneten Primer durchgeführt. Im Gegensatz zur üblichen PCR werden hier neben dNTPs auch Didesoxy-Nukleotide hinzugefügt, welche mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert wurden. Die Amplifikation erfolgt solange, bis es zum zufälligen Kettenabbruch durch den Einbau eines Nukleotids kommt, welches keine Phospho-Esterbindung mehr eingehen kann. Dabei entstehen unterschiedlich lange

Fragmente, die in einem Kapillarsequenzierer elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Farbstoffdetektion erfolgt mit Hilfe eines Lasers. Die anschließende Übersetzung in die DNA-Sequenz erfolgt softwaregestützt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteingemische können nach der Molekülmasse mittels Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Natrium-Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid und lagert sich an den positiv geladenen Teil der Proteine an, sodass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Pro g Protein werden etwa 1,4 g SDS gebunden, woraus ein konstantes Verhältnis aus Masse zu Ladung resultiert und die Auftrennung nach der Proteinmasse möglich ist. Bevor Proteine auf diese Weise separiert werden können, muss eine Aufbereitung stattfinden, die sich versuchsspezifisch unterscheidet. Um Proteinexpressionslevel in transfizierten Zellen nachzuweisen, wurden die in 6 cm-Schalen kultivierten HEK293-Zellen zwei Tage nach der Transfektion mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis gestellt und mit 300 µl Lysepuffer geerntet. Zur Homogenisierung wurden die Proben für ca. 3 s mit einer Amplitude von 10 % sonifiziert und anschließend abzentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden als Probe verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford- oder BCA-Test nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 30 µl Probe wurde mit 15 µl Ladebuffer (2x Lämmli) versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Zugabe von DTT, welches als Reduktionsmittel wirkt, erfolgte unmittelbar vor der Verwendung des Ladebuffers. Dann wurden die Proben auf ein 8 % SDS-Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V separiert. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurden 5 µl eines Proteinmarkers (Page Ruler) aufgetragen.

Lysepuffer pH 7,3

20 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
3 mM EDTA
1 % IGEPAL-CA 630
1 Tbl. Proteaseinhibitor /10ml
(Roche, cOmplete ULTRA Tablets Mini,
EDTA free)

2x Lämmli pH 6, 8

4 % SDS
20 % Glycerol
120 mM Tris-HCl
0,02 % Bromphenolblau
200 mM DTT

Trenngel 8 %	20 ml	Sammelgel	10 ml
H ₂ O demin.	9,3	H ₂ O demin.	6,8
30 % Acryl/bis	5,3	30 % Acryl/bis	1,7
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0	1,5 M Tris (pH 6,8)	1,25
10 % SDS	0,2	10 % SDS	0,1
10 % APS	0,2	10 % APS	0,1
TEMED	0,0012	TEMED	0,01

Laufpuffer (10 x)

144 g	Glycin
30 g	TrisBase
10 g	SDS
ad 1 l	H ₂ O demin.

2.2.3.2 Western-Blot

Um die Detektion der Proteine zu ermöglichen, müssen diese auf eine Trägerfläche gebracht werden. Dies erfolgt durch Anbringen eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zur Ebene des Polyacrylamidgels gerichtet ist. Die durch SDS-Anlagerung negativ geladenen Proteine migrieren in Richtung Anode und bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen am Trägermedium (PVDF-Membran) hängen. Als Transfermethode wurde das sog. Wet-Blotverfahren verwendet. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol vorbehandelt und zusammen mit dem SDS-Gel zwischen zwei in Blot-Puffer getränkte Filterpapiere geschichtet. Der Transfer erfolgte ca. 16 h über Nacht bei konstanter Stromstärke von 20 mA. Am nächsten Morgen wurde die Stromstärke für eine Stunde auf 120 mA erhöht. Die Dauer des Transfers sowie die Wahl der Stromstärke erfolgt in Abhängigkeit der Größe des zu detektierenden Proteins. Um unspezifisches Binden von anschließend eingesetzten Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran nach dem Transfer für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockmilch inkubiert.

Transferpuffer (10x) pH 8,3

144 g	Glycin
30 g	TrisBase
ad 1 l	H ₂ O demin.

Blockmilch (5 %)

25 g	Milchpulver
ad 500 ml	TBST

Transferpuffer (1x)

100 ml	Transferpuffer (10x)
200 ml	MeOH
ad 1 l	H ₂ O demin.

10x TBS pH 7,4

292 g	NaCl
24,2 g	TrisBase
ad 1 l	H ₂ O demin.

TBST

100 ml	10x TBS
500 µl	Tween 20
ad 1 l	H ₂ O demin.

Strippingpuffer pH 2,2

15 g	Glycin
1 g	SDS
10 ml	Tween 20

2.2.3.3 Immunochemische Detektion

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Nach dem Blocken der Membran wird zunächst mit einem spezifisch gegen das Protein gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C, der Antikörper ist meist 1:1000 in Blockmilch verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran für eine weitere Stunde bei RT inkubiert und dreimal für fünf Minuten mit ausreichend TBST gewaschen um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Antikörperlösung kann nach der Inkubation aufgefangen und für einige Wochen bei 4°C gelagert und wiederverwendet werden. Dann wurde die Membran 1 h bei RT mit einem an Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, welcher an mehrere Stellen spezifisch an Fc-Regionen des Primärantikörpers binden kann und dadurch zu einer Signalverstärkung führt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal hintereinander für 15 min mit TBST gewaschen. Die Visualisierung des Antigen-Antikörperkomplexes erfolgte durch die Inkubation mit ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence). ECL-Lösung enthält Luminol, dessen Oxidation durch die Meerrettichperoxidase katalysiert wird. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera visualisiert. Die Belichtungsdauer lag je nach Intensität der Banden zwischen 20 s und 3 min. Die an das Antigen gebundenen Antikörper können durch sog.

„Stripping“ mit einer sauren, denaturierenden Pufferlösung entfernt werden. Nach erneutem Blocken der Membran kann eine wiederholte Inkubation mit Antikörpern durchgeführt werden.

2.2.3.4 Bestimmung der totalen Rezeptorphosphorylierung durch metabolische Markierung mit [^{32}P]

Um die Menge der totalen Rezeptorphosphorylierung zu bestimmen, können lebende Zellen mit Radioisotopen wie z.B. [^{32}P]Orthophosphat markiert, anschließend stimuliert und die Menge des in den Rezeptor eingelagerten [^{32}P] Phosphats bestimmt werden. Stabil mit F β 2AR (Klon C4), F β 2AR SSS (Klon C1) oder F β 2AR AAA (Klon J) oder transient mit verschiedenen PTH-Rezeptorkonstrukten transfizierte HEK293-Zellen wurden 24-48 h vor der Stimulation mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer quantifiziert. 350000-500000 Zellen/Vertiefung wurden vor Versuchsbeginn in eine Mikrotiterplatte mit 6 wells („six-well-plate“) ausgesät. Da die Expression des F β 2AR SSS um etwa 25 % höher lag als die des F β 2AR (s. **Abbildung 3.2**), wurden entsprechend weniger Zellen für diese Bedingung ausgesät. Eine Stunde vor Stimulation wurden die Zellen zweimal mit phosphatfreiem KREBS-Puffer gewaschen und anschließend 1 h bei 37°C in phosphatfreiem KREBS-Puffer, angereichert mit 100 μCi ^{32}P , gehungert. Während dieser Zeit wird [^{32}P] Orthophosphat in die Zellen aufgenommen. Danach wurden die Zellen für mindestens 5 min mit entsprechenden Liganden bei 37°C stimuliert, wobei radioaktiv markiertes Phosphat an den C-Terminus der Rezeptoren geknüpft wird. Anschließend wurden die Zellen nach Absaugen des Überstandes sofort in 800 μl Lysepuffer lysiert. Zur Detektion der basalen Phosphorylierung wurden für jede Bedingung auch unstimulierte Zellen lysiert. Die Lysate stimulierter und unstimulierter Zellen wurden 30 min bei 13000 rpm/4°C zentrifugiert und 750 μl des Überstandes in frische Gefäße, in welchen je 50 μl anti-FLAG M2-affinity-gel oder anti-HA affinity-Matrix vorgelegt waren, überführt und für 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. In diesem Schritt, der auch als Immunpräzipitation bezeichnet wird, binden die mit einem Flag- oder HA-tag markierten Rezeptoren an einen gegen FLAG oder HA gerichteten Antikörper, der mit einer Agarose-Gelmatrix gekoppelt ist. Anschließend wurden die Lysate 1 min bei 4°C /1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml frischer Lysepuffer zur Gelmatrix hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde erneut bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Wasch-Schritt dient der Entfernung von unspezifisch an die Gelmatrix gebundenen ^{32}P sowie unspezifisch gebundenen Proteinen und wurde insgesamt 4-mal durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei diesem Arbeitsschritt Proteasen oder Phosphatasen noch aktiv sind, ist sehr gering,

daher wurden dem Lysepuffer, der zum Waschen verwendet wurde, keine Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt und die spezifisch gebunden Proteine mit 50 µl 2x Lämmli-Puffer von der Gelmatrix eluiert. Das im Lämmli-Puffer enthaltene SDS denaturiert die Antikörper sowie die daran gebundenen Proteine, DTT reduziert die Disulfidbrücken der Antikörper, sodass diese zerstört werden. Das Eluat wurde gevortext und einem 1-minütigem Zentrifugationsschritt, 5000 rpm bei Raumtemperatur, unterzogen. Zur Detektion der totalen Rezeptorphosphorylierung wurden 40 µl der Eluate auf ein 1,5 mm starkes 8 % SDS-Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Gesamtmenge an Rezeptoren wurden 5 µl des Eluats auf ein 1 mm starkes 8 % SDS-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V. Zur Fixierung der Proteine wurde das 1,5 mm starke Gel für 5 min in eine Methanol-Essigsäurelösung eingelegt und anschließend 1 h bei 80°C mit Hilfe eines Vakuumgeltrockners getrocknet. Das getrocknete Gel wurde je nach Intensität der Banden für 15 min bis zu 10 h mit einem Phosphorimager Screen in einer Röntgenfilmkassette exponiert und die Intensität mit Hilfe eines Cyclone Plus Phosphor Imagers ausgelesen. Alternativ erfolgte die Exposition mit Hilfe eines Röntgenfilms. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte wie ab 2.2.3.1 beschrieben. Die Intensität der mittels Westernblot entwickelten Rezeptorbanden wurde densitometrisch bestimmt.

1x KREBS-Puffer pH 7,3

118,4 mM	NaCl
4,69 mM	KCl
4,17 mM	NaHCO ₃
1,18 mM	MgSO ₄ *7H ₂ O
2,5 mM	CaCl ₂
11,7 mM	Glucose
10 mM	HEPES

Lysepuffer pH 7,3

20 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
3 mM	EDTA
1 %	1 % IGEPAL-CA 630
1 Tbl.	Proteaseinhibitor /10ml (Roche, cOmplete ULTRA Tablets Mini, EDTA free)
1 Tbl.	Phosphataseinhibitoren (Roche, PhosStop)

Fixierlösung		Waschpuffer
10 %	Eisessig	s. Lysepuffer, ohne Zusatz von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren
40 %	Methanol	
50 %	H ₂ O demin.	

2.2.3.5 Membranpräparationen

Unbehandelte oder mit entsprechenden Liganden behandelte Zellen wurden mit einer ausreichenden Menge an hypotonem Lysepuffer geerntet. Die Zellsuspension wurde für etwa 5 s bei zehnpromzentiger Amplitude sonifiziert. Es erfolgte eine optische Prüfung auf Homogenität der Proben, ggf. wurde erneut kurz sonifiziert, bis die Homogenität erreicht war. Dann wurden die Proben 1 h mit einer Geschwindigkeit von 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Membranpellets wurden entweder für MS/MS-Experimente (Tandem-Massenspektroskopie) oder für Ligandenbindungsversuche herangezogen. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Membranpellets, die nicht unmittelbar weiterverwendet werden konnten, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

hypotoner Lysepuffer pH 7,3

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
1 Tbl.	Proteaseinhibitor /10ml (Roche, cOmplete ULTRA Tablets Mini, EDTA free)
1 Tbl.	ggf. Phosphataseinhibitoren (Roche, PhosStop)

2.2.3.6 Radioligandenbindung

Das Ausmaß der Bindung eines Radioliganden unter sättigenden Bedingungen gibt Auskunft über die Expressionsdichte von Rezeptoren. Um die Expressionsdichte stabil transfizierter monoklonaler HEK293-Zelllinien zu vergleichen, wurden Membranen wie unter 2.2.3.5 beschrieben präpariert. Das Membranpellet wurde mit Puffer einmal gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde durch kurze Sonifizierung homogenisiert. Der Proteingehalt der Proben wurde photometrisch nach Bradford bestimmt. Gleiche Mengen an Proben wurden mit 46 nM [³H]-Dihydroalprenolol

über Nacht bei 4°C inkubiert. Da [^3H] Dihydroalprenolol auch unspezifisch an Proteine binden kann, wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 100 μM Alprenolol gemessen und von der spezifischen Bindung subtrahiert. Die Probenmessung erfolgte in Triplikaten. Zur Messung der unspezifischen Bindung wurden Duplikate eingesetzt. Gebundene und nicht gebundene Liganden wurden mit Hilfe von Glasfaserfiltern voneinander separiert. Die Filter wurden viermal mit eiskaltem Puffer, unterstützt durch eine semiautomatische Absaugvorrichtung, gewaschen. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsgefäße, welche je 2 ml Szintillatorflüssigkeit enthielten, überführt. Mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers wurde die Radioaktivität quantifiziert.

Resuspensionspuffer pH 7,4 Waschpuffer pH 7,4

100 mM	NaCl	50 mM	Tris-HCl
20 mM	Tris-HCl		

2.2.3.7 Internalisierung- und Recycling von $\beta 2$ -adrenergen Rezeptoren

Transient transfizierte HEK293T-Zellen wurden zwei Tage vor Beginn des Experiments in 6-Loch-Platten, welche mit PLL (1mg/ml) (s. 2.2.1.5) beschichtet waren, ausgesät. Am Tag des Experiments wurden die Zellen 1x mit 37°C warmen FG-Puffer gewaschen und anschließend entweder für 30 min bei 37°C mit 1 μM Isoprenalin (je drei wells pro Bedingung) in FG-Puffer stimuliert oder nur mit FG-Puffer inkubiert, um die Ausgangsmenge an Rezeptoren zu bestimmen. Nach 30 min wurden die 6-Loch Platten auf Eis gestellt, um zelluläre Austauschvorgänge zu verlangsamen und 4-mal mit kaltem FG-Puffer gewaschen, um den Agonisten zu entfernen. Anschließend wurde vorgewärmter FG-Puffer auf die Zellen gegeben und für 5, 15 und 30 min bei 37°C inkubiert um die Reintegration von Rezeptoren in die Membran zu erlauben. Danach wurde der Puffer vollständig entfernt und die Zellen wurden auf Eis belassen. Die 3 wells für den 0-min Wert wurden 1x mit kaltem FG Puffer gewaschen. Die wells zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 5-mal mit kaltem FG-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die vollständige Entfernung des Puffers und die Zellen wurden auf Eis belassen. Dann wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C entweder mit 500 μl FG/[^3H]CGP12177 oder mit 500 μl FG/ [^3H]CGP12177/Alprenolol auf einem Schaukler inkubiert. [^3H]CGP12177 ist ein Radioligand für den $\beta 2\text{AR}$, der nicht membranpermeabel

ist und sich daher zur Bestimmung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche eignet. Am Folgetag wurde die überstehende Lösung abgenommen und es erfolgten 2 Waschschrte mit kaltem PBS, welche auf Eis durchgeführt wurden. Pro Loch wurde dann 1 ml 0,5 M NaOH hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 800µl dieser Lösung wurden dann in ein Szintillationsgefäß überführt, welches 2 ml Szintillator enthielt, nach kurzem Vortexen wurden die Gefäße in eine β -Counter überführt. Jede Probe wurde 5 min mit dem Programm ^3H sensitiv ausgezählt.

FG-Puffer pH 7,4

130 mM	NaCl
5 mM	KCl
2 mM	CaCl_2
1 mM	MgCl_2
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

2.2.3.8 Rezeptorreinigung und Massenspektrometrie

Stabil transfizierte HEK293-Zellen, welche den PTHR oder den $\beta 2\text{AR}$ exprimierten, wurden in Schalen mit 15 cm Durchmesser bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Rezeptorreinigung wurden 15-30 Schalen geerntet, in 15-30 ml KREBS/ HEPES Puffer resuspendiert und mit den entsprechenden Liganden stimuliert. Die Membranen wurden dann wie unter 2.2.3.5 beschrieben präpariert und in 5 ml PBS mit 1 % NP40 inklusive Phosphatase- und Proteaseinhibitoren solubilisiert. Nach der Zentrifugation bei 20000 x g bei 4°C wurde der Überstand 1:1 mit PBS verdünnt und der Rezeptor wurde mit anti-HA bzw. anti-Flag-Harz immunpräzipitiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer wurde das Harz in 2x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden dann auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und durch SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mit kolloidalem Coomassie-Blau. Die Rezeptoren wurden dann aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mehrmals in 100 mM Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) gewaschen. Die Reduktion und Alkylierung von Cysteinen wurde mit 10 mM DTT in 50 mM TEAB für 30 min bei 60°C durchgeführt. Anschließend wurden 100 mM Iodoacetamid in 50 mM TEAB hinzugegeben und es wurde 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Gelfragmente wurden dann 3 mal 5 min mit

50 mM TEAB in 50 % Acetonitril gewaschen und dehydriert und anschließend in 50 mM TEAB, 10 % Acetonitril mit 1 µg Sequencing Grade Trypsin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die so erhaltenen tryptischen Peptide wurden getrocknet und in 1 ml Puffer, bestehend aus 250 mM Essigsäure und 30 % Acetonitril, resuspendiert. Die Anreicherung der phosphorylierten Peptide erfolgte durch die zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 20 µl PHOS-select[®], einem eisenhaltigen Affinitäts-Harz. Nach dem zweimaligen Waschen des Harzes in Resuspensionspuffer wurde einmal mit Wasser gewaschen. Dann erfolgte die Elution mit 200 µl Puffer (400 mM Ammoniumhydroxid, 30 % Acetonitril). Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (auch LC-MS/MS oder Tandem-Massenspektrometrie genannt) wurde mit einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer durchgeführt. Die aus dem tryptischen Verdau erhaltenen, gereinigten Proteine wurden auf eine Reverse-Phase-Chromatographiesäule (0,3 mm innerer Durchmesser x 1mm) mit einer Silikat-basierten stationären Phase (5 µm C18 300 Å Acclaim PepMap media) geladen. Die Elution erfolgte mit Hilfe einer Hochdruckeinspritzvorrichtung auf einer Umkehrphase-Kapillarsäule (75 µm innerer Durchmesser x 150 mm), die mit C18 Alkylresten verknüpft war (C18 100 Å). Die resultierenden MS/MS Spektren wurden mit Hilfe der MASCOT-Software (Matrix Science Ltd.) und der Datenbank UniProtKB/SwissProt zugeordnet. Die Peptidtoleranz lag bei 5 ppm und die MS/MS Toleranz bei 0,6 Da. Bei der Auswertung wurden Carbamidomethylcysteine als Modifikation festgelegt, Phosphoserine, Phosphothreonine und Phosphotyrosine und oxidiertes Methionin wurden als variable Modifikationen eingestellt. Als Spaltungsenzym wurde Trypsin/P gewählt und zwei verfehlte Spaltmöglichkeiten des Enzyms wurden zugelassen. (Butcher *et al.*, 2014)

2.2.4 Biophysikalische Methoden

2.2.4.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

2.2.4.1.1 Fluoreszenzmikroskope für FRET-und Translokationsmessungen
Die Durchführung von FRET-Experimenten erfolgte mit invertierten Fluoreszenzmikroskopen, die durch Platzierung der Objektive unter dem Objektisch das Bild durch den Boden des Probenbehälters erfassten. Die meisten Messungen wurden mit einem Nikon Eclipse Ti Mikroskop unter Verwendung eines 100x Ölimmersionsobjektivs (Nikon, Plan Apo VC 100X/1,40 Öl ∞ /0,17 Dic N2) durchgeführt. Die Anregung der Fluorophore erfolgte bei 415 bzw. 500nm mit LEDs (CoolLED, pE-2) bei konstanter

Lichtintensität von 2 %. Anfängliche Experimente am Nikon Setup wurden mit einer Xenonlampe (300W, Sutter Instruments, Lambda DG4) durchgeführt. Für die Anregung von CFP und YFP wurde ein ET430/24x bzw. ein ET500/20x Filter von Chroma verwendet. Um FRET detektieren zu können, ist ein Filter nötig, der sowohl für CFP- als auch für YFP-Fluoreszenz durchlässig ist. Hierzu wurde ein Langpassfilter (Chroma T455LP) verwendet. Zur Auswahl der Zellen und zur Bestimmung der Akzeptorfluoreszenzintensität wurde ein Dualbandstrahlenteiler in Kombination mit einem CFP/YFP-Emissionsfilter verwendet (Chroma 59017bs und 59017m). Zur simultanen Detektion der CFP- und YFP-Fluoreszenz bei unterschiedlichen Wellenlängen erfolgte die Trennung mit Hilfe eines Zwei-Wege-Bildteilers (Optosplit II, dichroischer Spiegel: z488/800-1064rpc, Filter: ET480/40 (CFP), HC534/20 (YFP), Chroma). Die CFP/YFP-Fluoreszenz wurde mit einer EMCCD-Kamera (Evolve 512, Roper Scientific) detektiert. Die Synchronisation von Lichtquelle und Kamera wurde durch eine Triggerbox (Nikon) gesteuert, der Kamerachip wurde zur einen Hälfte mit der optischen Wellenlänge der CFP-Emission und zur anderen Hälfte mit der optischen Wellenlänge der YFP-Emission belichtet. Alle Messungen wurden softwareunterstützt durchgeführt (NIS Elements 4.6). Für die unter 3.2.3 beschriebenen FRET- und Translokationsexperimente wurde ein weiteres invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Olympus, IX 71) eingesetzt. Hier wurde ebenfalls ein 100x Ölimmersionsobjektiv verwendet (Olympus, UPlanSApo 100x/ 1,40 Oil). Die Anregung von YFP erfolgte mit einem 491 nm Laser, CFP wurde bei 405 nm angeregt. Als Strahlenteiler wurde 405/ 491/ 642 DC (VisiTech international) eingesetzt. Die Trennung von CFP und YFP erfolgte mit einem Zwei-Wege-Bildteiler über den Strahlenteiler T495lpxr (Chroma). Die Filterung erfolgte durch zwei Filter, ET470/40x und ET535/30 (Chroma). Die Detektion erfolgte mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu, EM-CCD Digital Camera). Alle Messungen wurden durch die Software VoxCellScan (VisiTech international) unterstützt.

2.2.4.1.2 Durchführung von FRET-Messungen

Etwa 40 Stunden nach der Transfektion der cDNA in HEK293T-Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben, wurden die FRET-Messungen in lebenden Einzel- oder Doppelzellen durchgeführt. Dazu wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen in einer Metallkammer befestigt, mit Tyrode überschichtet und auf dem Objektisch befestigt. Nach der Auswahl einer Zelle, welche beide Proteine exprimiert, wurden die Zellen durch eine Perfusionsnadel eines Perfusionssystems (Ala-Scientific-Instruments, Ala-VC3-8SP) mit Tyrode oder entsprechenden Liganden in Tyrode angespült. Falls nicht anders angegeben,

wurden die Zellen bei 2,5 Hz mit einer Belichtungszeit von 40-60 ms bei einer Wellenlänge von 415 nm und einer LED-Intensität von 2 % belichtet. Die Fluoreszenz von CFP und YFP wurde gleichzeitig innerhalb des Bereiches der fluoreszierenden Zelle bestimmt. Gleichzeitig wurde auch ein Bereich des Hintergrunds gemessen. Zur Bestimmung der Akzeptorfluoreszenz wurde die Zelle bei einer Wellenlänge von 500 nm belichtet und die YFP-Fluoreszenz wurde notiert.

Tyrode (pH 7,34)

137 mM	NaCl
5,4 mM	KCl
10 mM	HEPES
2 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂

2.2.4.1.3 Auswertung von FRET-Messungen

Für jeden Messpunkt erfolgte die Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz von YFP und CFP. Die FRET-Änderungen wurden ratiometrisch bestimmt (F_{YFP}/F_{CFP}). Die YFP-Fluoreszenz wurde gegen den „Durchtritt“ der CFP-Fluoreszenz korrigiert. Da das Emissionsspektrum von CFP mit dem Emissionsspektrum von YFP überlappt, ist stets ein gewisser Prozentsatz der CFP-Fluoreszenz im YFP-Kanal zu detektieren (s. **Abbildung 2.1**). Dieser Prozentsatz ist unter anderem von den gewählten Filtern und der Lichtquelle abhängig und kann sich über die Zeit durch Veränderung des Filtermaterials ebenfalls ändern. Aus diesem Grund ist es erforderlich, das Ausmaß der fälschlich im YFP Kanal detektierten CFP-Fluoreszenz zu bestimmen. Dazu wurden Zellen verwendet die nur ein mit CFP markiertes Protein exprimierten. Die Zellen wurden bei 415 nm angeregt und der Anteil der im YFP-Kanal auftauchenden Fluoreszenz wurde über die Gesamtfluoreszenz im CFP Kanal ermittelt ($F_{YFP-Kanal}/F_{CFP-Kanal}$). Beide Werte wurden hintergrundkorrigiert. Das Ausmaß des CFP Durchtritts in den YFP-Kanal lag bei etwa 40 %.

Um das Ausmaß der Interaktion zwischen zwei Proteinen zu bestimmen, können die Absolutwerte der FRET-Änderung herangezogen werden (Amplituden). Hierzu muss zunächst sichergestellt werden, dass zum betrachteten Zeitpunkt das Maximum der Reaktion erreicht ist. Um die Interaktionsstärke zwischen fluoreszenzmarkierten Proteinen zu vergleichen, wurde für jede Einzelmessung die absolute FRET-Änderung aus mindestens 10 s der Plateauphase bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und dem jeweils unter der Abbildung angegebenen statistischen Test unterzogen. Bei der Bestimmung der Amplituden ist zu beachten, dass der FRET-Akzeptor stets im Überschuss vorliegt. Wäre ein Überschuss des FRET-Donors vorhanden, so würde bei der

ratiometrischen Darstellung F_{YFP}/F_{CFP} die absolute Änderung künstlich verkleinert und die Gefahr falscher Rückschlüsse über das Ausmaß der Interaktion gegeben. Um dies auszuschließen, wurde in jeder Zelle das Verhältnis der YFP- und CFP-Fluoreszenz bestimmt. Um sicherzugehen, dass der FRET-Akzeptor in der gemessenen Zelle im Überschuss vorlag, wurde zunächst eine Eichung durchgeführt. Hierbei wurde ein Eichkonstrukt eingesetzt, bei dem CFP und YFP in gleicher Stöchiometrie vorlagen. Das Verhältnis von YFP zu CFP des Referenzkonstruktes EYFP- β 2AR-CFP (Dorsch *et al.*, 2009) wurde von Valerie Wolters bestimmt und lag bei 11 gemessenen Zellen bei einem Mittel von 0,94. Werden statt CFP und YFP Derivate dieser Fluorophore eingesetzt, so ist ein entsprechend anderes Referenzkonstrukt zu verwenden. Nach jeder FRET Messung, deren Amplitude zur Auswertung herangezogen werden sollte, wurde die YFP-Fluoreszenz im CFP/YFP Emissionsfilter (s. 2.2.4.1.1) bestimmt und ins Verhältnis zur CFP-Fluoreszenz gesetzt. Alle Werte die bei $\geq 0,94$ lagen, exprimierten gleich viel oder mehr Akzeptorfluorophore als Donorfluorophore und wurden in die Auswertung miteingeschlossen.

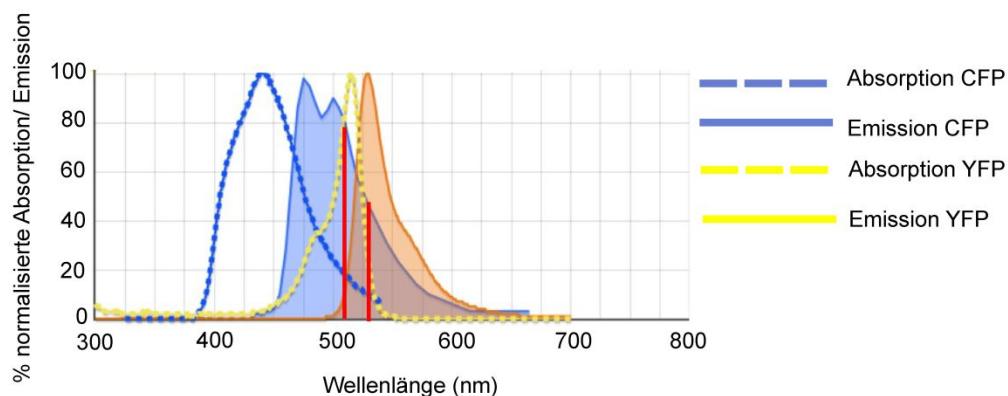


Abbildung 2.1: Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP. Die Abbildung zeigt den normierten Intensitätsverlauf der Absorption und Emission der beiden Fluoreszenzproteine CFP und YFP in Abhängigkeit der Wellenlänge. Der rot markierte Bereich kennzeichnet den Durchtritt von CFP in den YFP-Kanal. Das Spektrum wurde mit Hilfe eines Programmes erstellt (<http://www.biolegend.com/spectraalyzer>).

2.2.4.1.4 Kinetische Auswertung von FRET-Messungen

Um die Geschwindigkeit der Arrestin-Translokation bzw. der Arrestin-Dissoziation an bzw. von GPCR zu bestimmen, wurden für jede Einzelmessung monoexponentielle Kurvenanpassungen („fits“) mit Hilfe von Origin 9.0 Pro oder Graph Pad 4 durchgeführt. Die Berechnungen basierten auf folgender Gleichung: $y(t) = A * (e^{-k_{on/off} * t}) + y_0$. Die

Berechnung der Halbwertszeit erfolgte durch die Gleichung $t_{1/2} = \ln 2/k$. Die k -Werte einer jeden Messreihe wurden dann gemittelt und dem jeweils in der Abbildung angegebenen statistischen Test unterzogen. Es wurden nur k -Werte aus Kurvenanpassungen verwendet, deren Korrelationskoeffizient (R^2) $\geq 0,9$ war. Darüber hinaus wurden nur k -Werte verwendet, deren Standardfehler kleiner als 10 % war. **Abbildung 2.2** und **Abbildung 2.3** zeigen einen Standardfit für die „on-rate“ bzw. die Dissoziation von Arrestin vom Rezeptor („off-rate“). Zur besseren Vergleichbarkeit der Kinetik zwischen verschiedenen Messreihen werden diese als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Dazu wurde jede Einzelmessung folgendermaßen normiert: $((F_{YFP}/F_{CFP}) - (F_{YFP}/F_{CFP})_{t0}) / ((F_{YFP}/F_{CFP})_{\max} - (F_{YFP}/F_{CFP})_{t0})$.

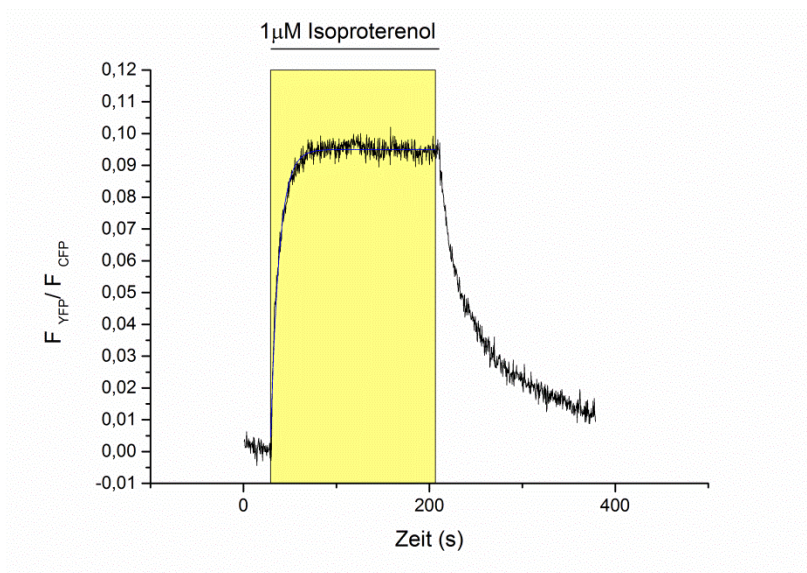


Abbildung 2.2: Exemplarischer Fit der „on-rate“

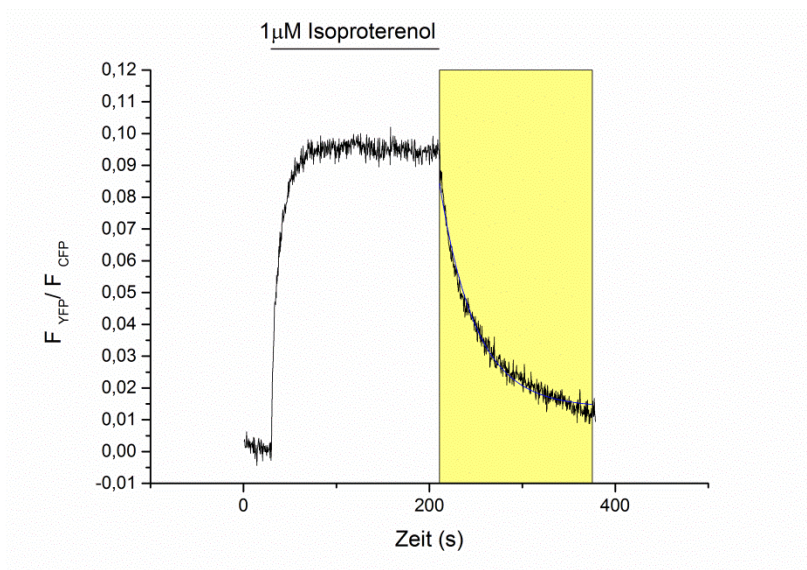


Abbildung 2.3: Exemplarischer Fit der Dissoziationskinetik

2.2.4.1.5 Auswertung von Konzentrations-Wirkungskurven

Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven wurden transfizierte Zellen mit steigenden Isoprenalinkonzentrationen stimuliert. Vor jeder erneuten Agonistapplikation wurden die Zellen mit Puffer überspült, was zur Folge hatte, dass das FRET-Signal fast auf das Basalniveau abfiel. Zur Auswertung wurden die absoluten FRET-Änderungen für jede Konzentration auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonistkonzentration normiert. Die Kurvenanpassung jeder Einzelmessung wurde mit einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve mit konstanter Hill-Steigung=1 vorgenommen, und der $\log(EC_{50})$ wurde bestimmt. Diese Daten wurden für die statistische Auswertung mittels ANOVA und nachfolgendem Bonferroni Posthoc-Test verwendet. Darüber hinaus wurde das arithmetische Mittel \pm Standardfehler für jede Agonistkonzentration berechnet und als Konzentrationswirkungskurve graphisch dargestellt.

2.2.4.1.6 Durchführung und Auswertung von Translokationsmessungen

Die in Kapitel 3.2.3 beschriebenen FRET- und Translokationsexperimente an PTH-Rezeptoren wurden von Sandra Engel am VisiTech Konfokalmikroskop (s. 2.2.4.1.1) durchgeführt. Im Abstand von 5 s wurde Arrestin-3-CFP bei 405 nm angeregt und die Fluoreszenzwerte von YFP und CFP wurden aufgezeichnet, um gleichzeitig FRET und Translokation zu messen. Die Stimulation erfolgte mit 100 nM PTH 1-34 in Tyrode, welcher mit 0,1 % delipidiertem BSA versetzt war. Die Aufnahme der Basallinie vor der Stimulation erfolgte 30 s lang unter Perfusion mit Tyrode/0.1 % BSA. Nach der Messung wurden YFP-markierte PTHR bei 488 nm direkt angeregt und die YFP-Fluoreszenz wurde notiert, um das Ausmaß der Akzeptorexpression wie unter 2.2.4.1.3 beschrieben zu bestimmen. Das Verhältnis der YFP/CFP-Fluoreszenz des Referenzkonstruktes (CFP-DOR-YFP) lag bei 7,5. Daher wurden alle Messungen, deren YFP/CFP-Verhältnis $\geq 7,5$ war, zur Auswertung herangezogen. Die Bestimmung des FRET erfolgte wie unter 2.2.4.1.3 beschrieben. Die Auswertung der Translokationsexperimente erfolgte durch Definition einer polygonalen ROI (region of interest) um die Membran der Zelle und einer polygonalen ROI um das Cytosol. Die Fluoreszenzintensität von Arrestin-3-CFP wurde für jeden Zeitpunkt als Quotient $F_{\text{Zytoplasma}} / F_{\text{Membran}}$ bestimmt.

2.2.4.2 Fluorescence recovery after Photobleaching (FRAP)

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Lebensdauer von Arrestin-Rezeptor-Komplexen die Zweifarben-FRAP-Methode eingesetzt. Dazu wurde ein kleiner Bereich innerhalb der Plasmamembran mit einem konfokalen Laserstrahl hoher Intensität gebleicht

und die Fluoreszenzwiederkehr von nicht geblichenem Arrestin-3-CFP- und YFP-markierten Rezeptoren wurde simultan erfasst.

2.2.4.2.1 Antikörperbehandlung der Rezeptoren

Um die Lateralmobilität von Arrestin-Rezeptor-Komplexen einzuschränken, wurden die Rezeptoren durch Antikörper quervernetzt. Bei der Untersuchung von N-terminal mit YFP markierten β 2AR wurden transient transfizierte HEK293T-Zellen mit Tyrode oder Tyrode-Glucose-Puffer (2.2.3.7 bzw. 2.2.4.1.2) gewaschen. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt mit einem polyklonalen anti-GFP-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung in 2,5 % delipidiertem BSA/Tyrode- bzw. Tyrode-Glucosepuffer bei 37°C. Zur Untersuchung von N-terminal mit HA markierten PTH-Rezeptoren waren zwei Inkubationsschritte erforderlich. Im ersten Schritt wurde 30 min mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper aus der Maus in einer 1:100 Verdünnung in 2,5 % delipidiertem BSA/Tyrode- bzw. Tyrode-Glucosepuffer bei 37°C inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Quervernetzung durch einen polyklonalen anti-Maus-Antikörper ebenfalls in einer 1:100 Verdünnung in 2,5 % delipidiertem BSA/Tyrode- bzw. Tyrode-Glucosepuffer bei 37°C. Nach der Antikörperbehandlung wurden die Zellen mit Tyrode gewaschen und mit 10 μ M Isoprenalin oder 100 nM hPTH 1-34 in 0,1 % delipidiertem BSA stimuliert und für FRAP-Experimente herangezogen.

2.2.4.2.2 Durchführung von FRAP-Experimenten

FRAP-Experimente wurden mit einem Leica SP5 Laser-Scanning Konfokalmikroskop durchgeführt (Leica, Wetzlar, Deutschland). Transfizierte, auf Deckgläschen gewachsene HEK293T-Zellen waren mit Agonistlösung (Isoprenalin oder hPTH 1-34 in Tyrode bzw. Tyrode/0,1 % BSA) überschichtet. Pro Deckglas wurde ein 3x1 μ m großer Plasmamembranbereich an 5-7 verschiedenen Zellen bei 20-23°C geblichen. Arrestin-3-CFP wurde mit einem Dioden-Laser bei 405 nm angeregt und die Emission wurde zwischen 450-489 nm gemessen. YFP-markierte Rezeptoren wurden bei 514 nm mit einem Argon-Laser angeregt, die YFP-Emission wurde zwischen 525-600 nm erfasst. Die Messungen an β 2AR (**Kapitel 3.1**) wurden mit einem 63 x 1.4 Ölimmersionsobjektiv mit einer Scan-Geschwindigkeit von 400 Hz mit 6-fachem Zoom durchgeführt. Das Bildformat lag bei 512x512 Pixel, die Weite des Pinholes betrug 95,55 μ m (airy 1). Bei allen nachfolgenden FRAP-Messungen (**Kapitel 3.2 und 3.3**) wurde die Scan-Geschwindigkeit

auf 1000 Hz erhöht und das Bildformat betrug 256x256 Pixel, weitere Parameter wurden nicht verändert. Die Laserintensitäten während des Bleichvorgangs betrugen 70 %, sodass bei der Bleichdauer von 300 ms bzw. 1 s 60-80 % der Fluoreszenzintensität verloren gingen. Für die Aufzeichnung der Fluoreszenzwiederkehr in Abhängigkeit der Zeit wurde die Laserintensität auf 10 % gesetzt. Die Fluoreszenzwiederkehr wurde zwischen 150 und 250 s aufgezeichnet. Alle FRAP-Messungen wurden mit Hilfe des FRAP-Wizards der LAS AF-Software (Leica) durchgeführt.

Bleichprotokoll:

	Präbleichen	Bleichen	Postbleichen 1	Postbleichen 2	Postbleichen 3
Anzahl	5	1	5	10	10-20
Abstand (s)	2	Dauer: 300 ms-1 s	2	5	10

2.2.4.2.3 Auswertung von FRAP-Messungen

Um den geblichenen Bereich in der Plasmamembran wurde eine „region of interest“ (ROI) definiert. Da je nach Laserintensität und Anzahl der Messpunkte Bleichvorgänge auftreten können, wurde zur Korrektur des Bleichens eine zweite ROI um die gesamte Zellmembran definiert (**Abbildung 2.4**). Die Fluoreszenzdaten für jeden Messpunkt wurden in ein Excel-Arbeitsblatt exportiert. Die fünf Messpunkte vor dem Bleichvorgang wurden gemittelt. Dann erfolgte die Normierung von ROI 1 bzw. ROI 2 auf den Mittelwert der Messpunkte vor dem Bleichvorgang. Zur Bleichkorrektur wurde der Wert aus ROI 2 vor dem Bleichvorgang durch alle Werte aus ROI 2 geteilt, sodass für jeden Messpunkt ein Korrekturfaktor erhalten wurde. Anschließend wurden alle Messwerte aus ROI 1 mit dem entsprechenden Korrekturfaktor multipliziert. Von der so erhaltenen korrigierten Kurve wurde der niedrigste Wert nach Bleichen abgezogen. Da die Emissionsspektren von CFP und YFP überlappen, wurde eine Korrektur vorgenommen. Von jeder YFP-Kurve wurden 12,8 % abgezogen. Dieser Korrekturfaktor wurde unter den beschriebenen Messbedingungen für den Durchtritt von Arrestin-3-CFP in den YFP-Kanal an 10 Zellen bestimmt. Die Kurven wurden dann gemittelt und mit Hilfe der folgenden biphasischen Funktion gefittet: $Y = Y_0 + \text{Span}_{\text{Fast}} * (1 - \exp^{(-K_{\text{Fast}} * X)}) + \text{Span}_{\text{Slow}} * (1 - \exp^{(-K_{\text{Slow}} * X)})$. Wenn keine Interaktion zwischen Arrestin und immobilisierten Rezeptoren stattfindet, so ist eine schnelle und vollständige Arrestin-Fluoreszenzwiederkehr in den geblichenen Bereich zu erwarten. Bei einer transienten Interaktion mit Rezeptoren ist mit einer Verlangsamung der

Fluoreszenzwiederkehr von Arrestin zu rechnen. Findet eine stabile Interaktion zwischen Arrestin und Rezeptoren statt, so ist Arrestin immobil, weshalb keine Fluoreszenzwiederkehr in den geblichenen Bereich zu erwarten ist (**Abbildung 2.5**).

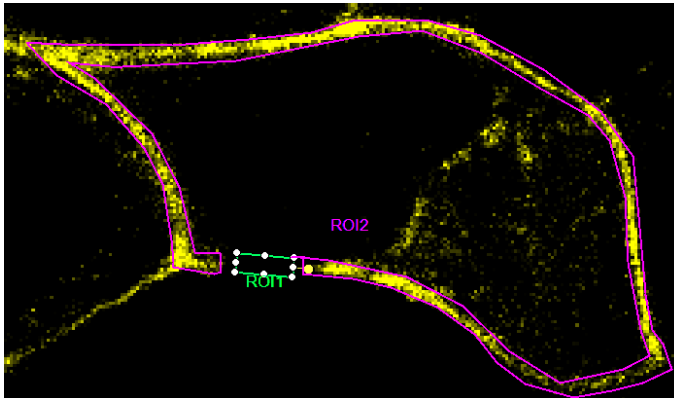


Abbildung 2.4: Auswertung von FRAP-Experimenten Die Abbildung zeigt eine konfokale Aufnahme einer transfizierten HEK293T-Zelle. ROI 1 markiert den Bereich an der Plasmamembran in welchem geblichen wurde. Der polygonale ROI 2 wurde mit Aussparung des geblichen Bereichs um die gesamte Plasmamembran definiert und dient der Bleichkorrektur.

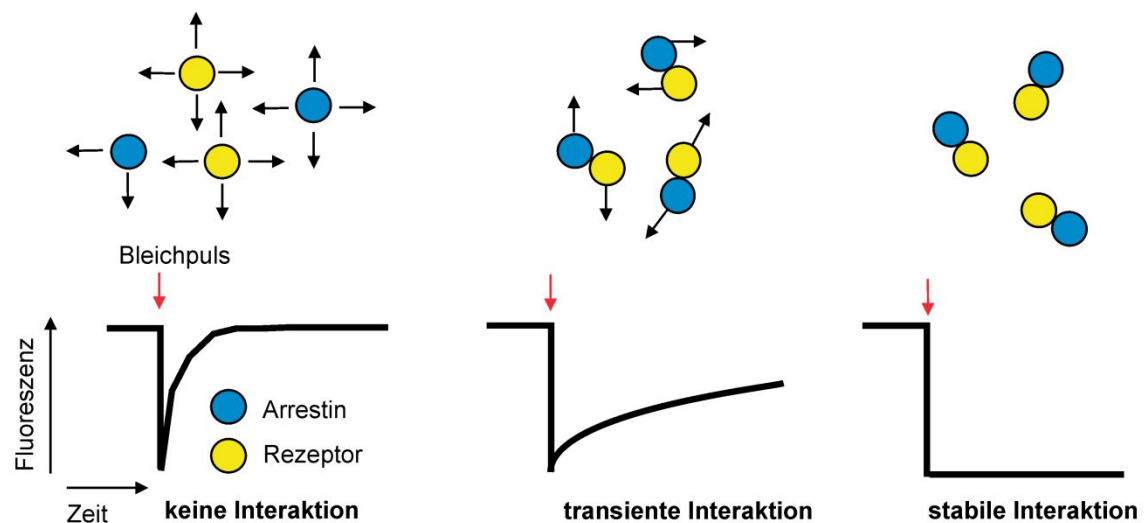


Abbildung 2.5: Veranschaulichung von Protein-Proteininteraktionsmessungen mittels FRAP Links: wenn Arrestin nicht mit dem immobilisierten Rezeptor interagiert, so ist eine schnelle und vollständige Rückkehr der Fluoreszenz in den geblichen Bereich messbar. Mitte: Bei einer transienten Interaktion zwischen Arrestin und Rezeptoren ist die Fluoreszenzwiederkehr von Arrestin nach Photobleichen verlangsamt. Rechts: Bei einer stabilen Interaktion zwischen Arrestin und Rezeptoren ist Arrestin immobil, weshalb keine Wiederkehr in den geblichen Bereich messbar ist. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Digby *et al.*, 2006.

2.2.4.3 Konfokalmikroskopie

Zur Visualisierung des Endozytoseverhaltens von Arrestin und Rezeptoren wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5, Leica, Wetzlar) mit einem 63x/1,4 NA Ölimmersionsobjektiv verwendet. Transfizierte HEK293T-Zellen wurden auf

Deckgläschen gebracht und mit dem jeweils angegebenen Liganden bei 37°C stimuliert. Stimulierte und unstimulierte Zellen als Kontrolle wurden mit 4 % PFA in PBS für 10-15 min bei Raumtemperatur fixiert und nach drei Waschschritten mit PBS mit Vectashield® auf Objektträgern fixiert. Arrestin-3-CFP wurde bei 405 nm mit einem Diodenlaser angeregt; die Emission wurde bei 450-490 nm gemessen. mCherry-EEA1 wurde bei 543 nm mit einem Helium-Neon-Laser angeregt; die Emission wurde bei 610-674 nm erfasst. YFP wurde bei 514 nm angeregt die Emission wurde bei 525-600 nm gemessen.

2.2.4.3.1 Bildanalyse

Zur Beurteilung der Kolokalisation wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient herangezogen. Dazu wurden ImageJ 1.47 und ein Kolokalisationsplugin (http://imagej.net/Colocalization_Test) verwendet. Von jeder Abbildung wurde der Hintergrund abgezogen und der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde wie folgt berechnet:

$$R_p = \frac{\sum(A_i - a) \times (B_i - b)}{\sqrt{[\sum(A_i - a)^2 \times \sum(B_i - b)^2]}}$$

A_i und B_i bezeichnen die Intensitäten einzelner Voxel, a bzw. b bezeichnen die durchschnittliche Gesamtintensität im jeweiligen Kanal.

2.2.5 Statistik und Software

Die aus FRET-und FRAP-Messungen erhaltenen Werte wurden in individualisierte Excel-Datenblätter exportiert und dort wie unter 2.2.4.1.3 bzw. 2.2.4.2.3 beschrieben korrigiert und normiert. Die Mess-Spuren wurden in Graph Pad Prism 4 oder Origin Pro 9.0 Student exportiert und dort wurden Kurvenanpassungen vorgenommen. Bei FRET-Messungen wurde jede Kurve einzeln angepasst. Das arithmetische Mittel der Zeitkonstanten oder der gesamten Mess-Spuren wurde mit dem Standardfehler aufgetragen. Bei FRAP-Messungen wurde zunächst das arithmetische Mittel mit Standardfehler aller Mess-Spuren einer Messreihe bestimmt, dann wurde das Plateau sowie k_{fast} und k_{slow} ermittelt. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus zum Vergleich zweier Messreihen wurde der t-Test nach Student verwendet. Wurden mehr als zwei Messreihen miteinander verglichen, wurde eine ANOVA durchgeführt. In Fällen, in welchen die Varianzen signifikant verschieden waren, wurde der Mann-Whitney-Test (t-Test) bzw. der multiple Vergleichstest nach Dunn

(ANOVA) durchgeführt. Zur Ansicht von MS/MS Spektren wurde Scaffold 4 benutzt. Zur Bildbearbeitung wurde MacBiophotonics Image J verwendet. Zur Überprüfung von Klonier- und Mutageneseergebnissen wurde ApE- A plasmid Editor 2.0.4.1 eingesetzt. CorelDRAW X4 wurde verwendet, um Abbildungen zu generieren.

3 Ergebnisse

3.1 Die zielgerichtete Hyperphosphorylierung des β 2-adrenergen Rezeptors verlängert die Interaktion mit Arrestin-3 und induziert dessen Internalisierung

Es ist bekannt, dass die Entfernung von Phosphorylierungsstellen in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die Rezeptorphosphorylierung vermindert und infolgedessen die Interaktion mit wichtigen Signalmolekülen wie z. B. Arrestin, beeinträchtigt (Krasel *et al.*, 2008). Wie jedoch wirkt sich das Einfügen von zusätzlichen Phosphorylierungsstellen in einen Rezeptor aus? Um diese Frage zu klären, wurde ein Serincluster gezielt in den proximalen C-Terminus des β 2-adrenergen Rezeptors (β 2AR) eingefügt. Dann wurde die Phosphorylierung und Internalisierung dieses Rezeptors sowie seine Affinität zu Arrestin-3 untersucht. Hierzu wurden verschiedene cDNA-Konstrukte von Rezeptormutanten des β 2AR sowie eine Chimäre aus β 2AR und V2R (β 2V2R) (Oakley *et al.*, 1999, 2000, 2001) im Vergleich zum Wildtyprezeptor entweder in transienten Transfektionen oder als stabile HEK293-Zelllinie eingesetzt. Zunächst wurde der Rezeptor mit einem zusätzlichen Serincluster als potentielle Phosphorylierungsstellen konstruiert. Hierzu wurden die Aminosäuren in Position 361-363 des menschlichen β 2AR gegen Serine ausgetauscht. Der so erhaltene Rezeptor wird im Folgenden als β 2AR SSS bezeichnet. Die Mutation erfolgte in Analogie zum β 2V2R (Oakley *et al.*, 1999), welcher im selben Abstand vom palmitoylierten Cystein 341 ein Cluster bestehend aus drei Serinen aufweist (**Abbildung 3.1**). Basierend auf Untersuchungen an der β 2V2R-Chimäre wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Austausch des C-Terminus zur Erhöhung der Arrestinaffinität am Rezeptor führt. Die Zunahme der Affinität wird durch phosphorylierte Serincluster vermittelt. Der Austausch des gesamten C-Terminus stellt einen Eingriff dar, welcher die Konformation des Rezeptors und dessen Plasmamembranintegration beeinträchtigen könnte. Darüber hinaus erfüllt der C-Terminus des β 2AR neben der Interaktion mit Arrestinproteinen zusätzliche Funktionen, wie zum Beispiel die Interaktionen mit dem Adapterprotein Grb2 (Karoor *et al.*, 1998) oder dem PDZ-bindenden Protein NHERF (Hall *et al.*, 1998), welches das schnelle Recyclen des Rezeptors nach agonist-induzierter Internalisierung vermittelt. Um die Spezifität der Untersuchung dieses Rezeptors zu belegen, wurden verschiedene Kontrollkonstrukte generiert (**Abbildung 3.1**). Wir sind in dieser Studie der Frage nachgegangen, ob die drei in den proximalen C-Terminus des

β 2-adrenergen Rezeptors inserierten Serine tatsächlich zusätzliche Phosphorylierungsstellen zu den bereits im Rezeptor vorhandenen Phosphorylierungsstellen darstellen und zugleich in der Lage sind die Arrestinbindung zum Rezeptor zu verstärken.

human β 2-AR

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNDISQGRNCSTNDSSL

β 2-AR SSS

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTSSSSGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNDISQGRNCSTNDSSL

β 2-AR AAA

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTAAASGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNDISQGRNCSTNDSSL

β 2-AR pd

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYAGNGNAGEQGGYHVEQEKENKLLCEDLPGAEDFVGHQGAVPGDNIDAQGRNCGANDALL

β 2-AR 2S

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNAGEQGGYHVEQEKENKLLCEDLPGAEDFVGHQGAVPGDNIDAQGRNCGANDALL

β 2-AR 3S

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYAGNGNASSSGGYHVEQEKENKLLCEDLPGAEDFVGHQGAVPGDNIDAQGRNCGANDALL

β 2-AR 5S

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNASSSGGYHVEQEKENKLLCEDLPGAEDFVGHQGAVPGDNIDAQGRNCGANDALL

β 2-AR SSS distal

F₃₃₆ QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNDISQGRNCSTNDSSL

β 2V2

F₃₃₆ QELLCARGRTPPSLGPQDESCTTASSSLAKDTSS

Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der verschiedenen β 2AR-Varianten Gezeigt sind die C-Termini ab Phenylalanin 336. Die im jeweiligen Konstrukt mutierten Aminosäuren sind unterstrichen und fett markiert. Im β 2V2R wurde der gesamte C-Terminus des β 2-adrenergen Rezeptors durch den des Vasopressin Rezeptors vom Typ 2 ersetzt. Die Konstrukte β 2AR AAA, β 2AR PD, β 2AR 2S, β 2AR 3S, β 2AR 5S und β 2AR SSS distal dienten als Kontrollkonstrukte.

3.1.1 Expression β 2-adrenerger Rezeptoren

Mit den Konstrukten Flag- β 2AR, Flag- β 2AR SSS und Flag- β 2AR AAA wurden stabile Zelllinien generiert, welche in MS/MS und 32 P-Experimenten zum Einsatz kamen. Dies bietet vor allem für MS/MS-Untersuchungen den Vorteil, dass für Zellpräparationen in größeren Maßstäben keine wiederholten transienten Transfektionen erforderlich sind, sondern der Rezeptor unter G418-Selektionsdruck (2.1.3) stabil exprimiert wird. Es wurden verschiedene Klone zunächst durch Immunfluoreszenz vorselektioniert (**Abbildung 3.2**) und anschließend wurde die Oberflächenexpression der Rezeptoren mit Hilfe eines Ligandenbindungsassays bestimmt. **Abbildung 3.2** zeigt, dass die Rezeptorexpression für Flag- β 2AR, Flag- β 2AR SSS und Flag- β 2AR AAA zwischen 64 und 79 pmol/mg Membranprotein lag. Für MS/MS-Experimente kamen Flag- β 2AR C4 (Klon 4) und Flag- β 2AR SSS C1 (Klon1) zum Einsatz. Für 32 P-Experimente wurde zusätzlich zu den bereits genannten klonalen Zelllinien noch Flag- β 2AR AAA J eingesetzt.

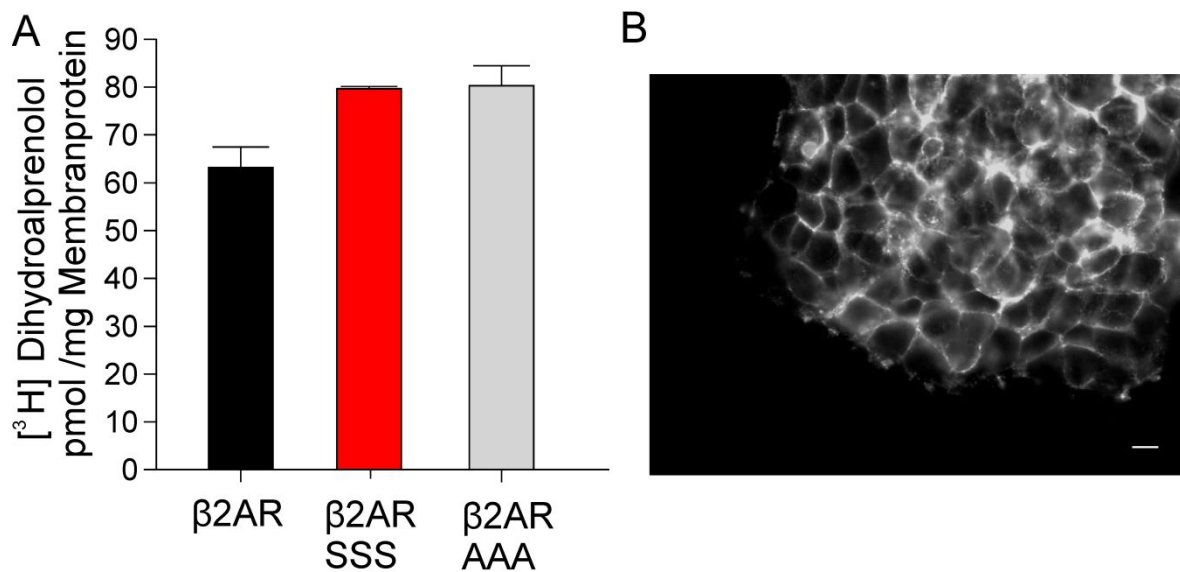


Abbildung 3.2: Rezeptorexpression stabiler Zelllinien (A) Membranen von stabil mit Flag-β2AR, Flag-β2AR SSS und Flag-β2AR AAA transfizierten HEK293-Zellen wurden mit 46 nM [³H] Dihydroalprenolol über Nacht bei 8°C inkubiert. Verwendet wurden die klonalen Zelllinien β2AR C4, β2AR SSS C1 und β2AR AAA J. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 100 μM unmarkiertem Alprenolol ermittelt. Gebundene und nicht gebundene Liganden wurden mit Hilfe von Glasfaserfiltern mittels Vakuumfiltration voneinander separiert. Die zurückgebliebene Radioaktivität auf den vierfach gewaschenen Filtern wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers ermittelt. (B) Permeabilisierte Zellen wurden mit einem gegen Flag-Epitope gerichteten Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Epifluoreszenzaufnahmen der Färbung dienten zur Verifikation der β2AR-Rezeptorexpression. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm.

3.1.2 Agonist-induzierte β2-Rezeptorphosphorylierung

Um zu untersuchen, ob das in den β2AR SSS inserierte Serinmotiv agonistabhängig phosphoryliert werden kann, wurden stabil mit Flag-β2AR SSS transfizierte HEK293-Zellen mit 20 μM Isoprenalin stimuliert und mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) untersucht. Ein Phosphatrest erhöht die Masse eines Peptids um + 80 Da, sodass ein Vergleich zwischen tatsächlicher und theoretischer Masse Rückschlüsse über phosphorylierte Stellen in einem Peptid erlaubt. Die Membranen der stimulierten Zellen wurden präpariert und durch eine Immunpräzipitation mit anti-Flag wurden die Rezeptoren angereichert. Nach der Isolation aus einem SDS-Gel erfolgten ein Reduktions- und ein Alkylierungsschritt, gefolgt von einer Trypsinbehandlung, wodurch tryptische Peptide entstanden. Phosphorylierte Peptide wurden durch Ionenaффinitätschromatographie angereichert und mittels MS/MS analysiert (**Abbildung 3.3**). Das tryptische Peptid (K)AYGNGYSSNGNTSSSSGYHVEQEKENK(L), welches das inserierte SSS-Motiv enthielt, konnte über 100-mal identifiziert werden. Jedoch war die Fragmentierung dieses Peptids, welches 27 Aminosäuren lang ist, sowohl von N-terminaler als auch von C-terminaler Seite her unzureichend, sodass eine zweifelsfreie Zuordnung der exakten

Position der phosphorylierten Aminosäure nicht möglich war. **Abbildung 3.4** zeigt ein MS/MS Spektrum, in welchem sechs aufeinanderfolgende y-Ionen auftauchten, die aus der Spaltung von Peptidbindungen der C-terminalen Seite resultieren. Die Fragmentierung in diesem Peptid hört direkt vor S364, welches das inserierte SSS-Motiv C-terminal begrenzt, auf. Die beiden doppelt geladenen y10 und y11 Ionen weisen beide jeweils eine Reduktion der Masse um -196 Da auf, was dem Verlust von zwei Phosphatgruppen an Stelle S363 (Teil des inserierten SSS-Motivs) und an Stelle S364 entsprechen könnte. Es wäre jedoch auch möglich, dass ein abgespaltenes Phosphat an Y366 sowie an S364 zu diesen Fragmenten führt. Da die Phosphorylierung von Tyrosin aber nur selten detektiert wird (Zhang and Neubert, 2011; Loroch *et al.*, 2013), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass S363 im inserierten SSS-Motiv phosphoryliert war. Im Vergleich dazu wurden auch MS/MS Untersuchungen an Wildtyp- β 2-Rezeptoren durchgeführt, die Resultate waren vergleichbar mit Daten aus der Literatur (Nobles *et al.*, 2011, Daten nicht gezeigt). Die Zuordnung der Peptidfragmente zu den Massen der einzelnen Aminosäuren erfolgte softwareunterstützt und kann mit Hilfe von Tabelle 3.7 im Ergebnisanhang nachvollzogen werden.

Um weiter zu prüfen, ob das inserierte SSS-Motiv im β 2AR SSS der agonistabhängigen Phosphorylierung unterliegt, wurden Radioimmunpräzitationsassays durchgeführt. Dabei wurde der Phosphorylierungsstatus des β 2AR SSS, des Wildtyprezeptors sowie eines Kontrollkonstrukts in welchem Alanine statt Serine in Position 361-363, (**Abbildung 3.1**) eingefügt waren (β 2AR AAA), durch metabolische ^{32}P -Inkorporierung und nachfolgende Immunpräzipitation untersucht (**Abbildung 3.5**). Diese Untersuchung wurde in stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Alle getesteten Bedingungen zeigten wenig Basalphosphorylierung. Nach 5-minütiger Stimulation der Rezeptoren mit 10 μM Isoproterenol war ein robuster Anstieg der Phosphorylierung zu beobachten. Die densitometrische Auswertung der Banden ergab einen substanziellen Anstieg um 40 % in der Phosphorylierung des β 2AR SSS verglichen mit dem Wildtyprezeptor (**Abbildung 3.5**). Dieses Resultat legt nahe, dass die zusätzlich eingefügten Serine im β 2AR SSS agonistabhängig phosphoryliert werden können. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache, dass der Anteil der totalen Rezeptorphosphorylierung am β 2AR AAA dem Wildtyprezeptor sehr ähnlich war, untermauert.

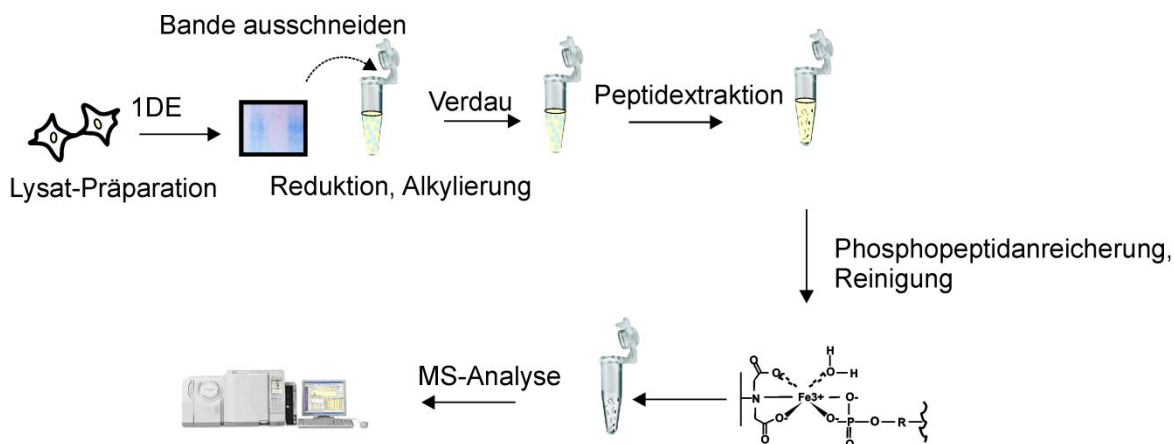


Abbildung 3.3: Ablaufschema der MS/MS Probenaufbereitung

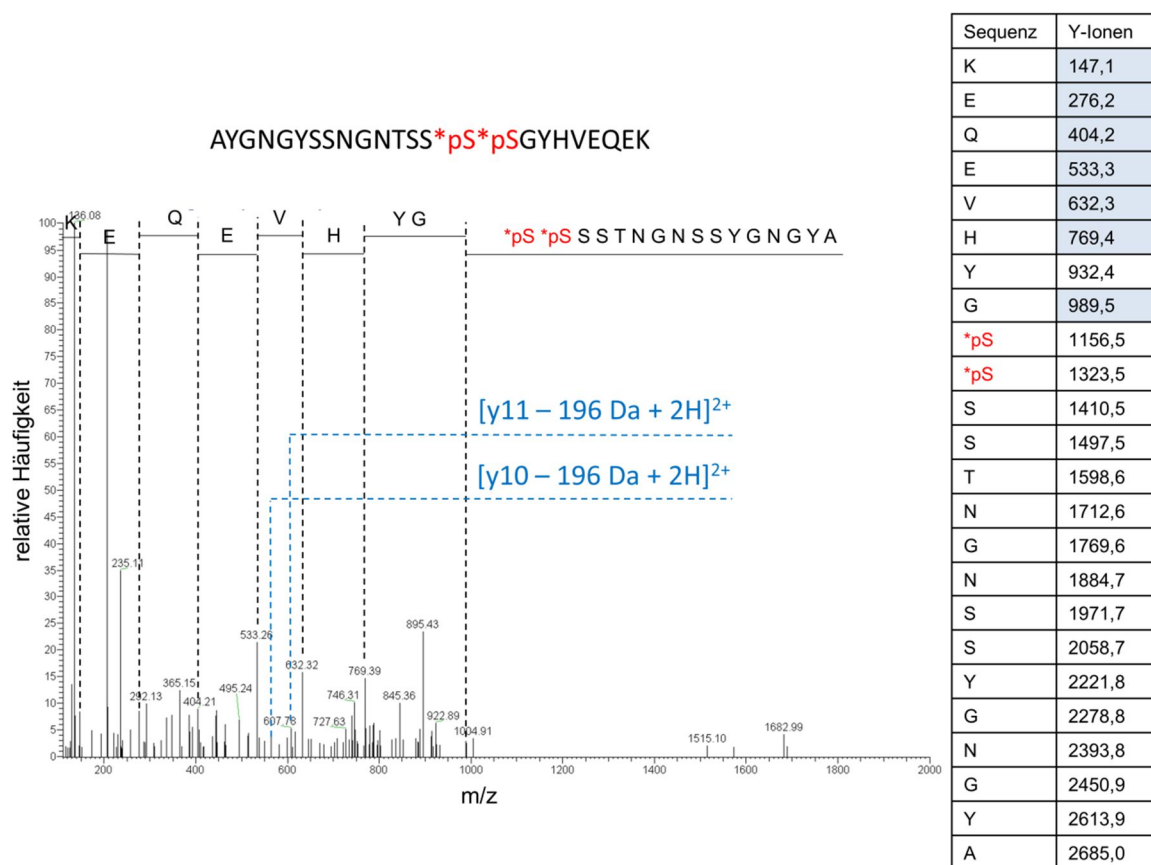


Abbildung 3.4: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids AYGNGYSSNGNTSSpSpSGYHVEQEK aus dem β 2AR SSS MS/MS Daten wurden mit der Datenbank UniProtKB / Swiss Prot mit Hilfe der Suchmaschine Mascot abgeglichen. Die relative Häufigkeit der Peptide wurde gegen das Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) aufgetragen. Die y-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. $[y_{10}$ bzw. $11 - 196 \text{ Da} + 2H]^{2+}$ kennzeichnet den Verlust zweier Phosphatgruppen an Stelle 10 bzw. 11 des C-Terminus im Peptid. Die doppelte Ladung führt zur Halbierung der Masse (m/z). Die Markierung mit einem Stern zeigt an, dass die phosphorylierte Aminosäure im Peptid nicht exakt lokalisiert werden konnte.

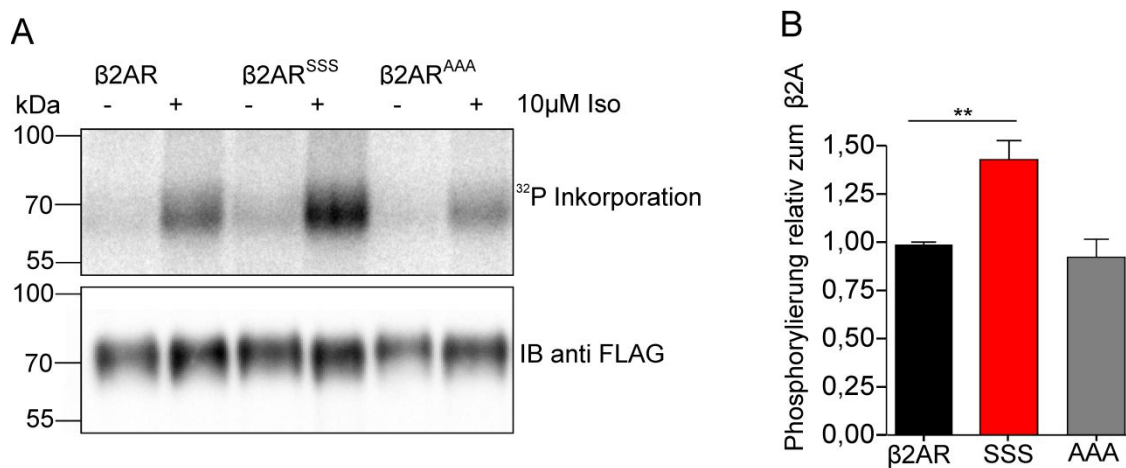


Abbildung 3.5: ³²P-Inkorporation nach Isoprenalinbehandlung (A) HEK293-Zellen, die entweder Flag-β2AR, Flag-β2AR SSS oder Flag-β2AR AAA stabil exprimierten, wurden 5 min mit 10 μM Isoproterenol stimuliert, lysiert, immunpräzipitiert und phosphorylierte Proteine wurden durch Autoradiographie visualisiert (obere Abbildung). Gleichmäßige Rezeptorexpression wurde mittels Westernblot bestätigt (untere Abbildung). (B) Die in A gezeigte agonist-induzierte Phosphorylierung wurde quantifiziert. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ± S.E.M. aus 3-5 unabhängigen Experimenten dar. **P < 0,01, ANOVA mit nachfolgendem Dunnetts multiplen Vergleichstest gegen Flag-β2AR als Kontrolle. Flag-β2AR vs Flag-β2AR AAA n.s.

3.1.3 β2-Rezeptorinteraktion mit G_s-Proteinen

Um zu klären, ob das Einführen des Serinclusters in den β2-adrenergen Rezeptor die Interaktion mit G_s-Proteinen beeinträchtigt, wurde ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer basierter Assay gewählt (FRET-Assay). Hierbei wurde die Interaktion zwischen Rezeptoren und der Gβγ-Untereinheit des heterotrimeren G_s Proteins nach ligandeninduzierter Rezeptoraktivierung untersucht (Hein *et al.*, 2006). In diesen Experimenten wurden lebende HEK293T-Zellen, welche transient mit verschiedenen β2-adrenergen Rezeptorkonstrukten und den drei G_s-Untereinheiten transfiziert waren, mit verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen zwischen 100 pM und 10 μM stimuliert (**Abbildung 3.6**). Steigende Agonistkonzentrationen führten zu einer reversiblen Zunahme der YFP-Fluoreszenz (gelbe Kurve) und zur gleichzeitigen Abnahme der CFP-Fluoreszenz (blaue Kurve, **Abbildung 3.6 A**). In diesem Versuch sind sowohl die Rezeptorexpression als auch die G-Proteinexpression erhöht und im Überschuss zu endogenem Arrestin und G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen vorhanden, daher ist hier wenig Rezeptordesensibilisierung zu erwarten. Die G-Protein Aktivierung des Wildtyprezeptors erfolgte im Mittel bei einem EC₅₀ Wert von 9,8 nM (**Abbildung 3.6 B**). Es wurde ein β2AR generiert, in welchem alle zwölf mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen zu Alanin oder Glycin mutiert wurden. Dieser Rezeptor ist maßgeblich im Ausmaß der Phosphorylierung reduziert (Bouvier *et al.*, 1988) (β2AR PD, **Abbildung 3.1**) und zeigte

einen mittleren EC_{50} -Wert von 7,7 nM. Dieser Wert war nicht signifikant verschieden von dem des Wildtyprezeptors (**Abbildung 3.6 B**). Für die Gs Proteinaktivierung durch $\beta 2AR$ SSS wurden tendenziell etwas höhere Isoprenalinkonzentrationen benötigt. Der mittlere EC_{50} -Wert lag bei 25,8 nM, war jedoch nicht signifikant verschieden vom Wildtyp (**Abbildung 3.6 B**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Einfügen eines zusätzlichen Serinclusters die G-Proteinaktivierung nicht maßgeblich beeinträchtigte.

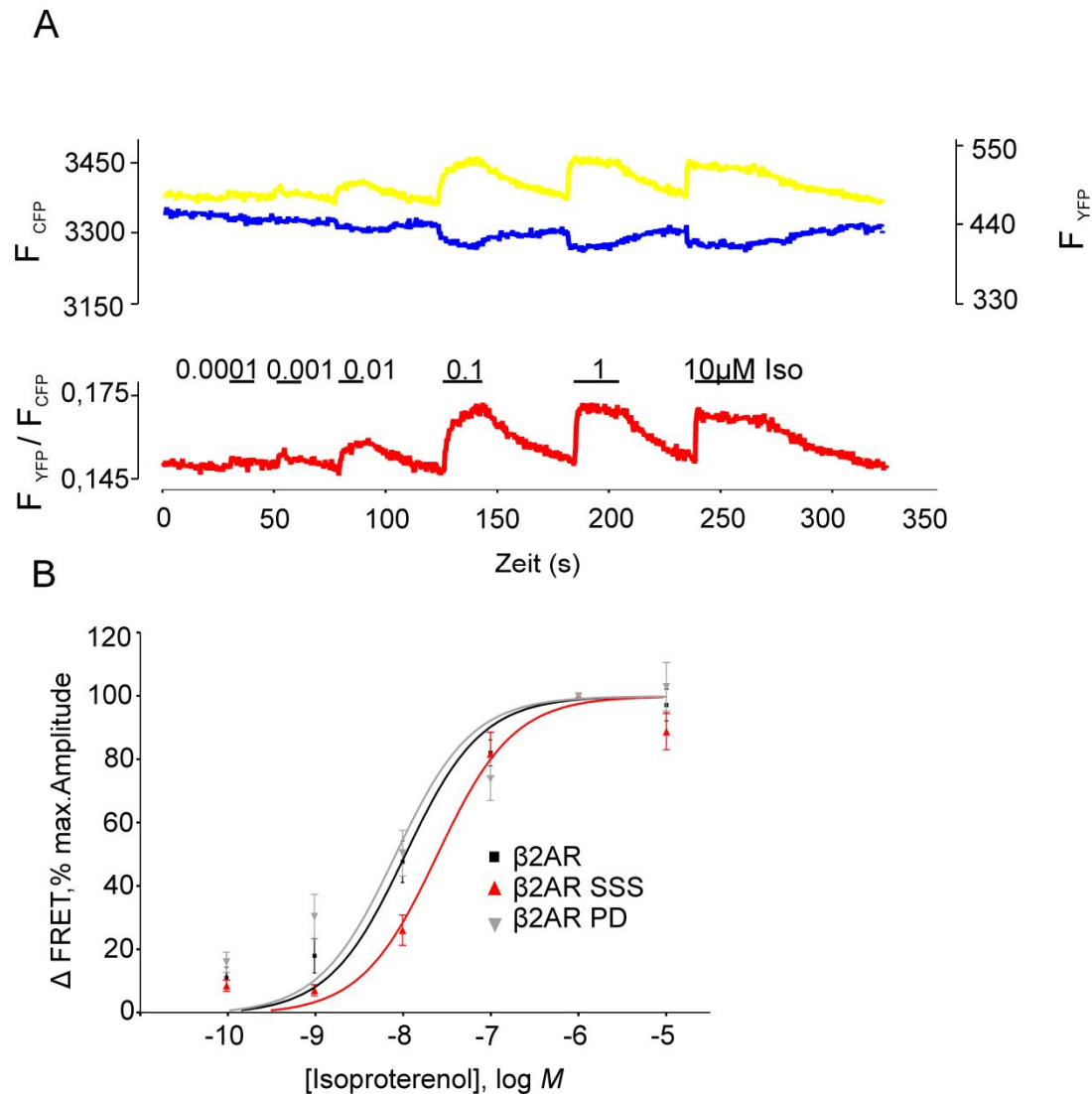


Abbildung 3.6: Untersuchung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion mittels FRET (A) Mit $\beta 2AR$ -YFP, $\beta 2AR$ SSS-YFP oder $\beta 2AR$ PD und G α_s , G $\beta 1$ -Cer und G $\gamma 2$ transfizierte HEK293T-Zellen wurden mit verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen stimuliert. Die repräsentative FRET-Messung in A zeigt die Interaktion zwischen G $\beta 1$ Cer und $\beta 2AR$ -YFP nach Stimulation mit verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen. (B) Konzentrations-Wirkungskurven für die Rezeptor/ G-Protein-Interaktion mit $\beta 2AR$, $\beta 2AR$ SSS oder $\beta 2AR$ PD (n=7-9) wurden durch die Amplitudenauswertung der FRET-Änderungen erhalten. Die FRET-Änderung nach der Stimulation mit 1 μM Isoprenalin wurde auf 100 % gesetzt. Individuelle Kurven wurden auf Basis einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurve mit konstanter Steigung=1 gefittet um die EC_{50} -Werte zu erhalten. Die Statistik der erhaltenen EC_{50} Werte wurde mit einem einseitigem ANOVA-Test und nachfolgendem multiplen Bonferroni-Vergleichstest durchgeführt. $P=0,136$

3.1.4 β 2-Rezeptorphosphorylierung und -interaktion mit Arrestin

β 2-adrenerge Rezeptoren rekrutieren Arrestin phosphorylierungsabhängig. Das Entfernen von phosphorylierbaren Serinen oder Threoninen im proximalen C-Terminus des β 2AR führt zur erheblichen Verringerung der Arrestin-3-Bindung, während die distal gelegenen Phosphorylierungsstellen die Affinität des Rezeptors zum Arrestin nicht beeinflussen (Krasel et al., 2008). Um die Kinetik der Arrestin-Rezeptor Assoziation- und Dissoziation zu untersuchen, bedienten wir uns eines FRET-basierten Versuchsaufbaus. Hierbei waren Arrestin-3 und der β 2AR mit YFP bzw. CFP markiert (Krasel *et al.*, 2005). Die Translokationsrate von Arrestin-3 an den β 2AR AAA war verglichen mit dem β 2AR oder β 2AR SSS signifikant verlangsamt (**Abbildung 3.7 A**, k_{on} , **Tabelle 3.1**). Noch mehr hervorzuheben ist jedoch, dass die Dissoziationsrate von Arrestin-3 am mutierten β 2AR SSS verglichen mit dem β 2AR signifikant verlangsamt war (k_{off} , **Abbildung 3.7**, **Tabelle 3.1**). Darüber hinaus war das Ausmaß der Arrestindissoziation vom β 2AR nahezu vollständig, deutlich weniger Arrestin dissoziierte jedoch innerhalb des beobachteten Zeitraumes vom β 2AR SSS. Mit dem β 2V2R war die Arrestin-Interaktion innerhalb des Zeitfensters der Messung kaum reversibel (**Abbildung 3.7**, **Tabelle 3.1**). Das geringere Ausmaß und die Verlangsamung der Arrestindissoziation vom β 2AR SSS verglichen mit β 2AR suggeriert, dass die Inserierung von zusätzlichen Phosphorylierungsstellen in den β 2AR die Affinität des Rezeptors zum Arrestin steigert.

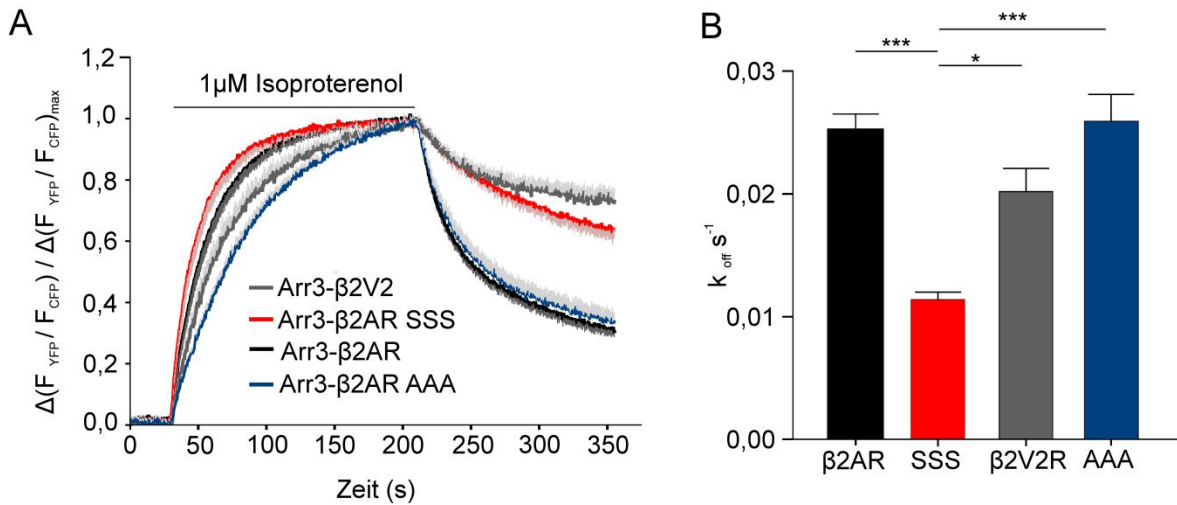


Abbildung 3.7: Echtzeitbestimmung der Arrestin-3-Dissoziationsrate von β_2 -adrenergen Rezeptoren (A) Die Daten der Interaktion von Arrestin-3 mit β_2 AR, β_2 AR SSS, β_2 AR AAA, oder β_2 V2R wurden zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der Normierungen auf die individuellen FRET-Änderungen der Einzelmessungen; zur besseren Visualisierung sind die Standardfehler nur in einer Richtung aufgetragen. HEK293T-Zellen wurden transient mit Arrestin-3-CFP, GRK2 und mit C-terminal mit YFP markierten β_2 -Rezeptoren transfiziert. Die Dynamik der Arrestin-3-Interaktionen wurde mittels FRET bestimmt. Die Zellen wurden mit Pufferlösung (Tyrode) 30 s lang perfundiert, dann erfolgte 180 s lang die Applikation von 1 μ M Isoproterenol in Tyrode, gefolgt von 180 s Auswaschen mit Tyrode. Die Zeitkonstante der Arrestinrekrutierung (k_{on}) nach Applikation des Liganden wurde durch eine monoexponentielle Anpassung bestimmt ($n=9-23$). Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunns multiplen Vergleichstest durchgeführt. *** $P < 0,001$ (β_2 AR AAA vs β_2 AR SSS), ** $P < 0,01$ (β_2 AR vs β_2 AR AAA). (B) Die Dissoziationskonstanten (k_{off}) \pm S.E.M. von Arrestin-3 nach Auswaschen des Liganden wurden errechnet. Die Dissoziationskurven wurden gemäß einer monoexponentiellen Gleichung gefittet ($n=8-23$). Mittels Kruskal-Wallis-Test und nachfolgendem Dunns multiplen Vergleichstest wurde die statistische Signifikanz ermittelt. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Tabelle 3.1: Zeitkonstanten aus FRET-Experimenten zwischen Arrestin-3 und verschiedenen β 2-Rezeptoren k_{on} , k_{off} und $t_{0,5}$ der Arrestin-3 Dissoziation nach Stimulation mit Isoprenalin wurden mit Hilfe einer monoexponentiellen Gleichung ermittelt (s. Material und Methoden). Die Translokationskonstante unter endogenen GRK2 Bedingungen konnte nicht bestimmt werden, da das Plateau innerhalb des beobachteten Zeitraumes nicht erreicht wurde. n.a. nicht auswertbar

FRET	$K_{on} \pm \text{S.E.M.}$ (s^{-1})	$k_{off} \pm \text{S.E.M.}$ (s^{-1})	$t_{0,5 on}$ (s)	$t_{0,5 off}$ (s)	(%) Anteil Arr-3- Dissoziation \pm S.E.M.
β2AR (+GRK2)	$0,040 \pm 0,004$	$0,025 \pm 0,001$	17,3	27,7	$69,1 \pm 2,1$
β2AR AAA (+GRK2)	$0,017 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,002$	40,8	26,7	$65,3 \pm 3,2$
β2AR SSS (+GRK2)	$0,061 \pm 0,008$	$0,011 \pm 0,001$	11,4	63,0	$36,1 \pm 3,1$
β2V2R (+GRK2)	$0,026 \pm 0,004$	$0,020 \pm 0,002$	26,7	34,7	$27,4 \pm 4,9$
β2AR	n.a.	$0,026 \pm 0,002$	n.a.	26,7	$59,1 \pm 5,1$
β2AR SSS	n.a.	$0,019 \pm 0,002$	n.a.	36,5	$41,7 \pm 5,6$

3.1.5 Arrestin-3- β 2-Rezeptorinteraktion nach Adrenalinstimulation und anschließender Isoprenalinstimulation

Es wurden weitere Arrestin3-Rezeptor-FRET Experimente durchgeführt, um zu überprüfen ob das geringere Ausmaß und die Verlangsamung der Arrestindissoziation (s. Kapitel 3.1.4) auch nach Stimulation mit dem endogenen Liganden Adrenalin auftritt. Die Geschwindigkeit der Arrestin-3-Translokation war unter Stimulation mit 10 μ M Adrenalin am β 2AR SSS tendenziell schneller als am β 2AR (k_{on} , **Abbildung 3.8 A, C**). Vor allem die Dissoziationsraten nach Entfernen des Adrenalins waren am β 2AR SSS und am β 2V2R gegenüber den Dissoziationsraten am β 2AR signifikant verlangsamt (**Abbildung 3.8 D**). Im zweiten Teil des Experiments wurden die Zellen nach Auswaschen des Adrenalins einer erneuten Stimulation mit 1 μ M Isoprenalin ausgesetzt. **Abbildung 3.8 C** zeigt, dass der zweite Agonistimpuls die Arrestintranslokation vor allem am β 2AR und β 2V2R gegenüber dem ersten Agonistimpuls signifikant beschleunigt. Dies ist auf das

sogenannte Phosphorylierungsgedächtnis des β 2-adrenergen Rezeptors zurückzuführen. Hierbei ist davon auszugehen, dass nach dem ersten Agonistimpuls bestimmte Serine und Threonine im proximalen C-Terminus phosphoryliert werden und die Phosphorylierung zum Teil auch nach Auswaschen des Agonisten noch vorhanden ist, sodass Arrestin bei erneuter Ligandenstimulation schneller an den Rezeptor binden kann (Krasel *et al.*, 2005; Reiner *et al.*, 2009). Das Auswaschen des Liganden Isoprenalin nach dem zweiten Agonistimpuls resultierte einerseits in einer Verringerung des Ausmaßes sowie in einer Verlangsamung der Kinetik der Arrestin-3-Dissoziation, vergleichbar mit den Ergebnissen die bereits zuvor nach Auswaschen des Isoprenalins am β 2AR, β 2AR SSS und β 2V2R beobachtet wurden (vgl. **Abbildung 3.8** B, D mit **Abbildung 3.7** B).

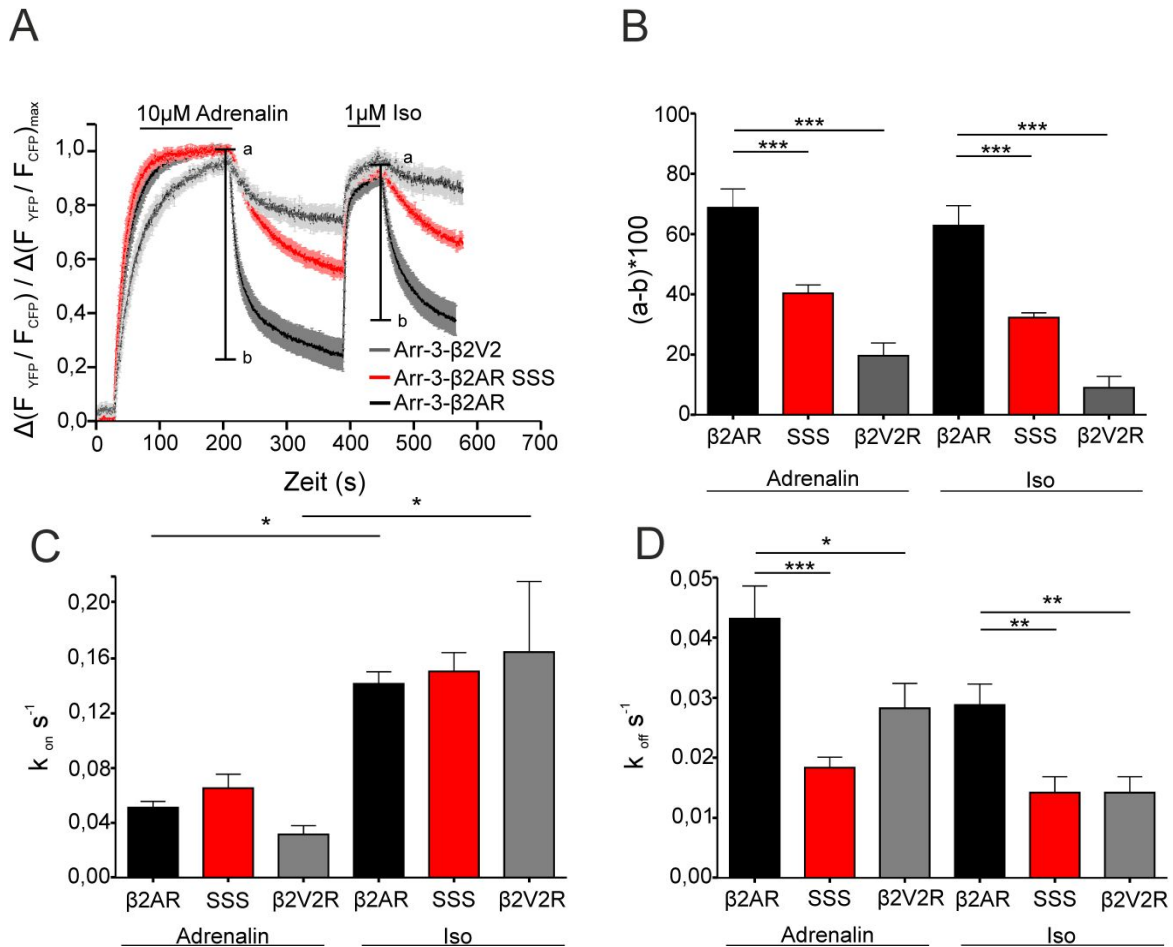


Abbildung 3.8: Arrestin-3-Interaktion β 2-adrenerger Rezeptoren nach wiederholter Ligandenapplikation (A) Die Arrestin-3-Interaktion mit β 2AR, β 2AR SSS oder β 2V2R wurde mittels FRET bestimmt. HEK293T-Zellen wurden transient mit den genannten YFP-markierten Rezeptoren, Arrestin-3-CFP und GRK2 transfiziert. Zum Vergleich der Kinetik wurden die Einzelmessungen auf die individuelle FRET-Änderung normiert und gemittelt (MW \pm S.E.M. (n=7-9)). (B) Die Anteile der Arrestin-3-Dissoziation nach Auswaschen der Liganden Adrenalin bzw. Isoprenalin wurden bestimmt, wie in A dargestellt. Es wurde eine ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni multiplen Vergleichstest durchgeführt, ***P < 0,001 (C) Die Geschwindigkeit des FRET-Anstiegs $k_{on} \pm$ S.E.M. wurde bestimmt. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunns multiplen Vergleichstest durchgeführt, * P < 0,05. (D) Mittels monoexponentiellem Fit errechnete Dissoziationskonstanten, ANOVA mit nachfolgendem Bonferronis multiplen Vergleichstest ***P<0,001; **P <0,01; *P<0,05.

3.1.6 Interaktion von visuellem Arrestin mit verschiedenen Varianten des β 2-adrenergen Rezeptors

Obwohl bekannt ist, dass visuelles Arrestin bevorzugt mit Rhodopsin interagiert, konnte durch *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass auch der β 2AR, allerdings mit 5-15 fach geringerer Affinität mit visuellem Arrestin interagieren kann (Attramadal *et al.*, 1992; Lohse *et al.*, 1992; Gurevich *et al.*, 1995). In früheren Studien konnte mittels konfokalmikroskopischer Analyse keine Translokation von visuellem Arrestin an den β 2AR, MOR, D1AR oder den α 1bAR in lebenden Zellen beobachtet werden. Am AT1R,

TRHR sowie am V2R war die Translokation von visuellem Arrestin aber sehr ausgeprägt (Oakley *et al.*, 2000). Um zu überprüfen, ob die *in vitro* Studien der Interaktion zwischen visuellem Arrestin und dem β 2AR in unserem experimentellen System reproduzierbar sind, wurde ein FRET-basierter Ansatz in HEK293T Zellen gewählt. **Abbildung 3.9** zeigt, dass der β 2AR schwach mit visuellem Arrestin interagierte, was sich in einem etwa einprozentigem Anstieg der FRET-Änderung widerspiegelte. Die Interaktion mit β 2AR SSS war mit einem Signalanstieg von 1,5-2 % tendenziell ausgeprägter, jedoch nicht signifikant verschieden vom β 2AR. Deutlich verstärkt, mit einem FRET-Anstieg von etwa 5 %, verlief jedoch die Interaktion zwischen visuellem Arrestin und dem β 2V2R (**Abbildung 3.9**).

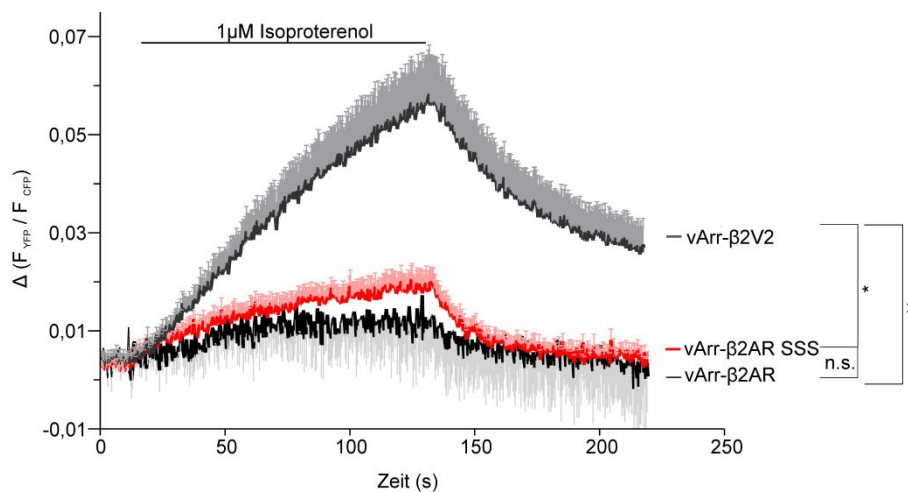


Abbildung 3.9: Interaktion β 2-adrenerger Rezeptoren mit visuellem Arrestin HEK293T-Zellen wurden transient mit den YFP-markierten β 2-Rezeptorkonstrukten (β 2AR, β 2AR SSS, β 2V2R), mit CFP markiertem visuellem Arrestin (v-Arr) und GRK2 transfiziert. Isoproterenolabhängige FRET-Änderungen wurden über den Zeitraum von 3 min beobachtet. Die Einzelmessungen wurden gemittelt, zur besseren Visualisierung wurden die S.E.M.-Werte der absoluten FRET-Änderungen nur in einer Richtung dargestellt. Der statistische Test für die Auswertung der FRET-Amplituden wurde mit einem Kruskal-Wallis-Test und nachfolgendem Dunns-Test durchgeführt (n=9-10). ** P < 0,01 * P < 0,05.

3.1.7 Bestimmung der Arrestin-3-Affinität in Abwesenheit überexprimierter GRK2

Die in **Abbildung 3.7**, **Abbildung 3.8** und **Abbildung 3.9** beschriebenen Beobachtungen wurden in Anwesenheit von überexprimierter GRK2 gemacht. Wir untersuchten daher, ob die beobachteten Unterschiede in der Arrestindissoziation von den beschriebenen Rezeptorkonstrukten auch unter endogenen GRK2 Expressionsverhältnissen auftreten. In HEK293T Zellen, welche nicht mit GRK2 cotransfiziert waren, war die Dissoziationsrate von Arrestin-3 vom Wildtyprezeptor nicht signifikant verschieden von den Zellen mit überexprimierter GRK2 (**Abbildung 3.10**). Der mutierte β 2AR SSS hingegen, wies eine

verglichen zum Wildtyp signifikant verlangsamte Dissoziationsrate auf (**Abbildung 3.10, Tabelle 3.1**).

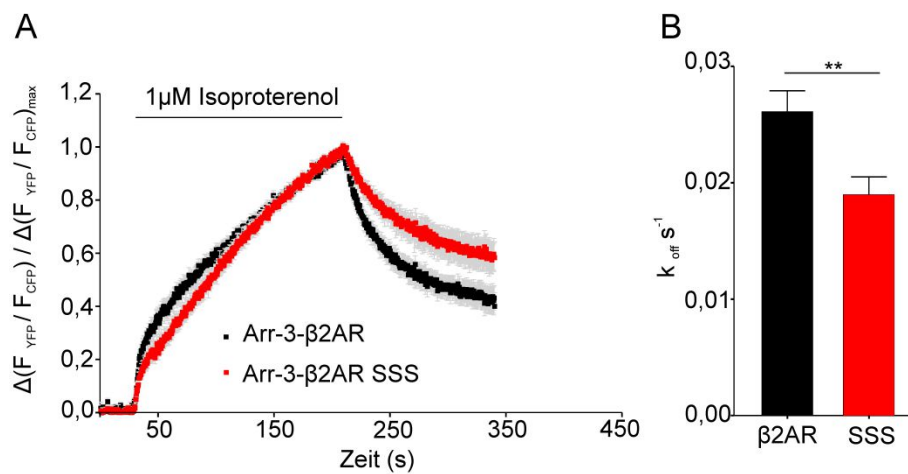


Abbildung 3.10: Bestimmung der Arrestin-3 Affinität in Abwesenheit von GRK2 (A) HEK293T-Zellen wurden transient mit β 2AR-YFP oder β 2AR SSS-YFP sowie mit Arrestin-3-CFP transfiziert, die Daten wurden, gemessen, normiert, gemittelt (n=9-11) und ausgewertet wie unter **Abbildung 3.7** beschrieben. (B) $k_{off} \pm$ S.E.M, t-Test nach Student, **P<0,01.

3.1.8 Ausmaß der GRK 2 Überexpression

Um das Ausmaß der GRK2 Überexpression zu bestimmen, wurden die GRK2- Expressionslevel in transfizierten und nicht transfizierten Zellen untersucht. Wie in **Abbildung 3.11** gezeigt, erscheint die Proteinbande im Westernblot in der Bedingung, in welcher GRK2 überexprimiert war, etwa dreimal stärker als in untransfizierten Zellen (basal). Berücksichtigt man die Transfektionseffizienz von etwa 50-60 %, so ist davon auszugehen, dass GRK2 in zellulären FRET und Konfokalexperimenten etwa um den Faktor 5-6 überexprimiert war.

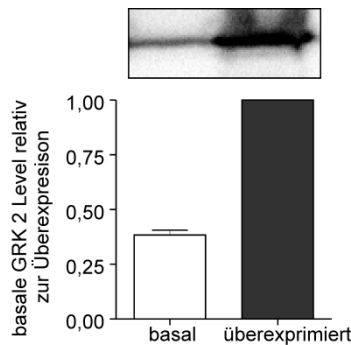


Abbildung 3.11: GRK2-Expression HEK293T-Zellen wurden transient mit 0,6 μg GRK2 transfiziert. Transfizierte und nicht transfizierte Zellen wurden lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die GRK2 Expression wurde mittels Westernblot visualisiert (n=3). Als Erstantikörper diente anti-GRK2 (C-15, sc-562, Santa Cruz).

3.1.9 Die Rezeptorphosphorylierung determiniert das Ausmaß der Arrestininteraktion

Wie unter 3.1.4 beschrieben, kann der $\beta 2\text{AR}$ SSS Arrestin-3 mit verstärkter Affinität binden. Wir führen die Steigerung der Arrestinaffinität auf die Inserierung des SSS-Clusters und dessen Phosphorylierung zurück. Es wurde überprüft ob dieser Cluster allein phosphoryliert werden kann und ob diese Phosphorylierung dann zur Arrestinbindung führen kann. Daher wurde ein $\beta 2\text{AR}$ -Konstrukt generiert, welches auf Basis des $\beta 2\text{AR}$ PD ausschließlich in Position 361-363 drei eingefügte Serine sowie die PKA-Phosphorylierungsstellen enthielt ($\beta 2\text{AR}$ 3S, **Abbildung 3.1**). Darüber hinaus wurde ein Konstrukt kloniert, welches nur Serin 355, 356 enthielt ($\beta 2\text{AR}$ 2S). Um die Möglichkeit der Phosphorylierung durch PKA auszuschalten, wurden die Zellen in Gegenwart des PKA Inhibitors KT 5720 stimuliert. Die agonist-abhängige Phosphorylierung des $\beta 2\text{AR}$ 2S, $\beta 2\text{AR}$ 3S, $\beta 2\text{AR}$ 5S und $\beta 2\text{AR}$ PD wurde verglichen. $\beta 2\text{AR}$ 3S zeigte einen substantiellen Anstieg der ligandenabhängigen Phosphorylierung, welcher dem Anstieg der Phosphorylierung des $\beta 2\text{AR}$ 2S ähnelte (**Abbildung 3.12 A**). Dies legt nahe, dass eines oder mehrere der eingefügten Serine agonistabhängig phosphoryliert wurden. Der stärkste Anstieg in der Rezeptorphosphorylierung war messbar, wenn Serin 355 und 356 in Kombination mit dem SSS-Cluster ($\beta 2\text{AR}$ 5S) vorlagen, was die Vermutung bestätigt, dass der eingefügte 3S Cluster als Substrat für GRK dienen kann. Um die Auswirkung des Ausmaßes der Rezeptorphosphorylierung auf die Arrestinrekrutierung zu untersuchen, wurde der Anstieg des FRET-Signals zwischen Arrestin-3-CFP und YFP-markiertem $\beta 2\text{AR}$ PD, $\beta 2\text{AR}$ 2S, $\beta 2\text{AR}$ 3S sowie $\beta 2\text{AR}$ 5S bestimmt (**Abbildung 3.13 A**). Zwischen Arrestin-3 und $\beta 2\text{AR}$ PD war ein sehr kleines FRET-Signal messbar. Für die stabile Arrestininteraktion sind sowohl die Aktivierung als auch die Phosphorylierung des

Rezeptors nötig (Krasel *et al.*, 2005; Gurevich und Gurevich, 2006). Allerdings führten Ser 355, 356 (β 2AR 2S) oder SSS im Bereich der Aminosäuren 361-363 (β 2AR 3S) zu einem deutlichen Signalanstieg. Durch die Kombination der beiden genannten Motive in dem Konstrukt β 2AR 5S war ein weiterer Signalanstieg zu beobachten (**Abbildung 3.13 A**). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Unterschiede in den FRET-Amplituden aus ungleichen Expressionsverhältnisse zwischen YFP- und CFP-markierten Proteinen resultierten, wurden die relativen Expressionsverhältnisse bestimmt (siehe 2.2.4.1.3). Wie in **Abbildung 3.13 B** gezeigt, bestand kein signifikanter Unterschied in der Stöchiometrie der fluoreszenzmarkierten Proteine. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die relativen FRET-Änderungen durch unterschiedliche Proteinexpressionsverhältnisse zustande kamen.

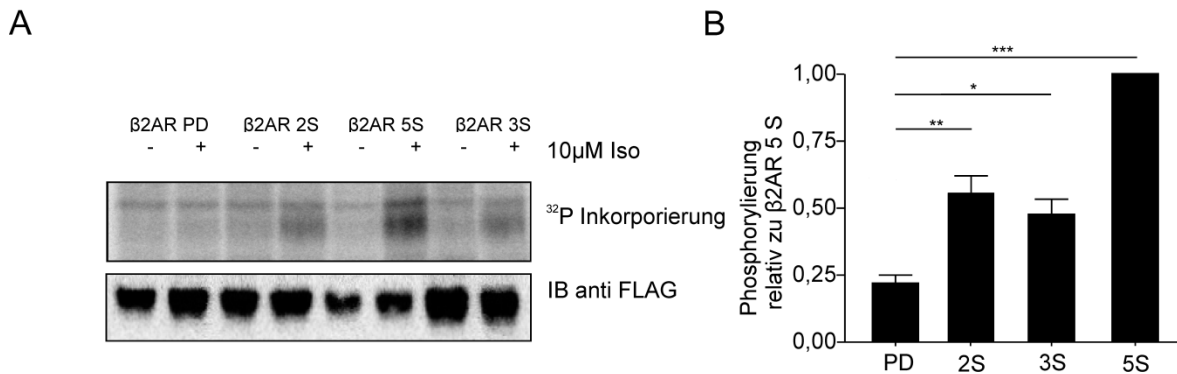


Abbildung 3.12: β 2AR-Phosphorylierung im inserierten SSS-Cluster (A) HEK293T-Zellen wurden transient mit β 2-Rezeptoren mit der angegebenen Anzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen transfiziert und 30 min mit 1 μ M des PKA-Inhibitors KT5720 vorinkubiert. Dann erfolgte 60 min bei 37°C die metabolische Markierung mit 32 P. Mit Isoprenalin stimulierte Rezeptoren wurden lysiert, immunpräzipitiert und die phosphorylierten Proteine wurden mittels Autoradiographie visualisiert; Rezeptorexpression gezeigt mittels Westernblot (untere Abbildung). (B) Quantifizierung der Rezeptorphosphorylierung wie unter A gezeigt. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm S.E.M dreier voneinander unabhängiger Experimente dar. ***P<0,001; **P <0,01; *P<0,05, ANOVA mit anschließendem multiplen Bonferroni Vergleichstest.

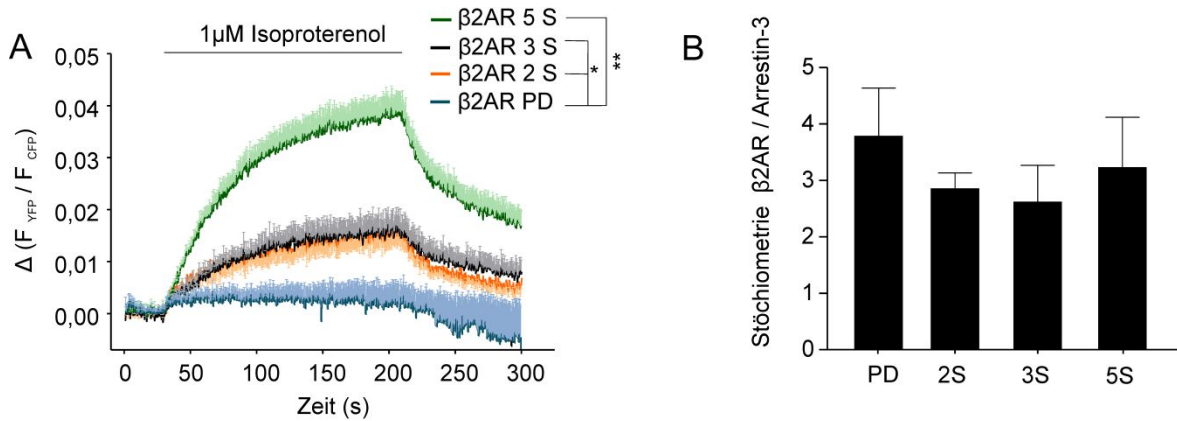


Abbildung 3.13: Die Anzahl der Phosphorylierungsstellen und das Ausmaß der ligandenabhängigen Arrestin-3-Rezeptorinteraktion (A) HEK293T-Zellen wurden transient mit den angegebenen YFP-markierten Rezeptoren, GRK2 und Arrestin-3-CFP transfiziert. Agonist-induzierte FRET Änderungen wurden gemittelt (Mittelwert \pm S.E.M $n \geq 6$) und sind als absolute FRET-Änderungen dargestellt. Zur besseren Visualisierung sind die mittleren FRET-Kurven mit dem Standardfehler von $\Delta F_{YFP}/F_{CFP}$ nur in eine Richtung aufgetragen. Vergleich der Amplituden: $^{***}P < 0,01$; $^{*}P < 0,05$, ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplen Vergleichstest. (B) Relative Expressionslevel der verschiedenen β2AR-Mutanten und Arrestin-3-CFP zeigten für alle Bedingungen den FRET-Akzeptor YFP im Überschuss und keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Bedingungen (Kruskal-Wallis-Test).

3.1.10 Einfluss eines distalen SSS-Clusters auf die Arrestin-Affinität

Um die Relevanz der Lokalisation des SSS-Clusters zu analysieren, wurden die drei Aminosäuren 397-399 (NID) im β2AR mit drei Serinen ersetzt (SSS distal, **Abbildung 3.1**). Die Affinität von Arrestin-3-CFP zu diesem Rezeptor mit einem SSS-Motiv im distalen C-Terminus wurde mittels FRET bestimmt. Die Dissoziationskinetik von Arrestin-3 am β2AR mit einem distalen SSS-Motiv war vergleichbar mit der des Wildtyprezeptors (**Abbildung 3.14**), was sich in den übereinanderliegenden Spuren nach Auswaschen des Liganden widerspiegelt. Der Vergleich dieser Daten mit den Dissoziationskinetiken des β2AR mit dem SSS-Cluster im proximalen C-Terminus zeigt, dass die Arrestin-3-Affinität durch einen zusätzlichen SSS-Cluster im proximalen, aber nicht im distalen C-Terminus erhöht werden kann.

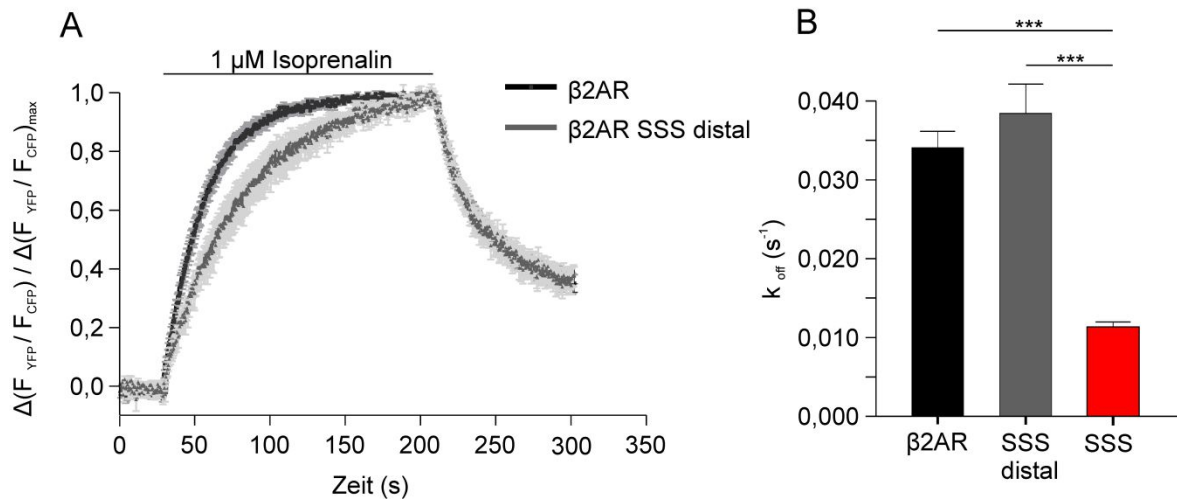


Abbildung 3.14: Arrestin-3-Interaktion am β 2AR mit einem distalen SSS-Motiv
 HEK293T-Zellen die vorübergehend Arrestin-3-CFP, GRK 2 und entweder den C-terminal YFP-markierten β 2AR oder den β 2AR mit einem distalen SSS-Cluster exprimierten, wurden stimuliert und gemessen wie in **Abbildung 3.7** beschrieben ($n \geq 7$). (A) FRET-Änderungen normiert auf die individuelle Maximalantwort. (B) Die Arrestin-3-Dissoziationsraten wurden bestimmt. Die gemittelte Spur der Interaktion zwischen Arrestin-3 und β 2AR SSS wurde bereits in **Abbildung 3.7** gezeigt. Die Statistik der Dissoziationsraten wurde mittels ANOVA und einem Bonferroni Posthoc-Test durchgeführt, *** $P < 0.001$. Es wurden die gleichen Werte der Dissoziationsraten wie in **Abbildung 3.7**. für die Statistik verwendet.

3.1.11 Arrestin-Rezeptor-Interaktion in kontinuierlicher Gegenwart eines Agonisten

Während des Auswaschens des Agonisten durchläuft der Rezeptor eine konformationelle Änderung vom aktiven Zustand hin zum inaktiven Zustand. Der Hauptanteil der bisher bekannten Änderungen des β 2AR im aktiven Zustand schließt die α -helikale Ausdehnung des cytoplasmatischen Endes von Transmembrandomäne 5 (TM5), sowie eine kleine Aufwärtsbewegung von TM6 ein (Chung et al., 2011). Im inaktiven Zustand dissoziiert Arrestin vom Rezeptor. Um zu untersuchen, ob die Arrestin-Affinität im aktiven Zustand des Rezeptors durch unterschiedliche Muster an phosphorylierbaren Serinen verändert werden kann, wurde eine FRAP-basierte Untersuchungsmethode (2.2.4.2) eingesetzt. Hierbei wurde der Zeitverlauf der Arrestinassoziation- und dissoziation am β 2AR, β 2AR SSS sowie am β 2V2R im agonistgebundenen Zustand mittels Zweifarben-FRAP untersucht. Alle Rezeptorkonstrukte, die für diesen Versuch verwendet wurden, waren N-terminal mit YFP markiert. Die Rezeptoren wurden mit Hilfe eines polyklonalen YFP-Antikörpers an der Plasmamembran immobilisiert (Dorsch et al., 2009). Anschließend wurden die Rezeptoren mit 10 μ M Isoprenalin stimuliert, was die Translokation von Arrestin an die Plasmamembran zur Folge hatte. Ein kleiner Ausschnitt der

Plasmamembran der Größe $3 \times 1 \mu\text{m}$ wurde mit Hilfe von hoher Laserintensität geblichen und die nachfolgende Wiederkehr der Fluoreszenz von immobilisierten Rezeptoren und Arrestin-3 in diesen Bereich wurde gleichzeitig mit niedriger Laserintensität aufgenommen (**Abbildung 3.15**). Die Quervernetzung der Rezeptoren durch die Behandlung mit polyklonalen Antikörpern reduzierte die Lateraldiffusion der Rezeptor-Arrestinkomplexe, sodass die Wiederkehr der YFP-Fluoreszenz bei etwa 20 % lag (**Abbildung 3.15 D**), die Wiederkehr von nicht quervernetzten Rezeptoren lag bei etwa 50-60 % (**Abbildung 3.15 F**). Die gemessene Wiederkehr von fluoreszierendem Arrestin-3 ergibt sich daher aus der Austauschrate zwischen Arrestin-3 und Rezeptoren. Diese besteht aus der Arrestindissoziation vom und der Reassoziaton an die jeweiligen immobilisierten Rezeptoren. Der Zeitverlauf der Fluoreszenzwiederkehr in den geblichenen Bereich wurde mit einer biexponentiellen Gleichung analysiert (2.2.4.2). **Abbildung 3.15 C** zeigt die mittlere Fluoreszenzwiederkehr von Arrestin 3-CFP an den $\beta 2\text{AR}$, $\beta 2\text{AR SSS}$ oder $\beta 2\text{V2R}$. **Tabelle 3.2** fasst die errechneten Zeitkonstanten sowie die korrespondierenden Halbwertszeiten und das Ausmaß der Arrestinwiederkehr zusammen. Die langsame Komponente der Arrestin-3-Wiederkehr am $\beta 2\text{AR SSS}$ war etwa 1,5 fach langsamer als am $\beta 2\text{AR}$, während das Ausmaß der Wiederkehr hier unverändert war. Dagegen war die Rate der Arrestin-3-Wiederkehr zum $\beta 2\text{V2R}$ gegenüber dem Wildtyprezeptor dreifach verlangsamt und das Ausmaß etwa 2,5 fach reduziert (**Tabelle 3.2, Abbildung 3.15 C**). Darüber hinaus wurde die Kinetik der Arrestin-3-Wiederkehr an Flag-markiertem $\beta 2\text{AR}$ oder $\beta 2\text{AR SSS}$ in clathrinbesetzten Stachelsaumgrübchen in HeLa Zellen mittels TIRF-Mikroskopie untersucht. (Daten nicht gezeigt s. Zindel et al., 2015) Unstimulierte Rezeptoren zeigten niedrige Raten an Arrestin-3-Clustern, die Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ Isoproterenol löste innerhalb weniger Minuten die Anreicherung von Arrestin-3 in clathrinbesetzten Stachelgrübchen aus. Die Arrestin-3 Wiederkehr an den $\beta 2\text{AR SSS}$ war gegenüber der Wiederkehr an den Wildtyprezeptor dreifach verlangsamt.

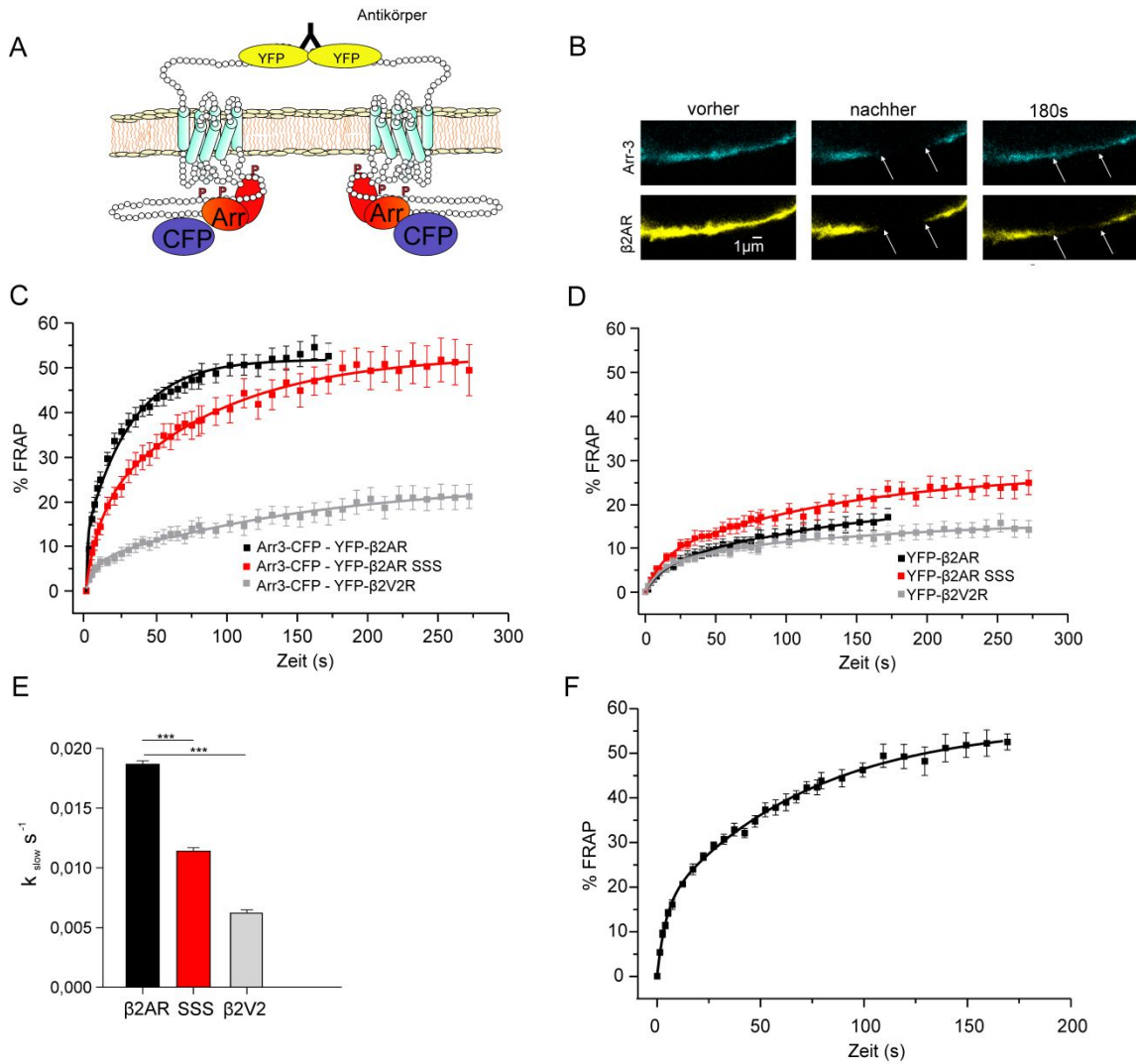


Abbildung 3.15: Bestimmung der Arrestin-3 Mobilität mittels Zweifarben-FRAP in Anwesenheit des Agonisten HEK293T-Zellen wurden transient mit dem N-terminal YFP-markierten β2AR, β2AR SSS oder dem β2V2R sowie Arrestin-3-CFP und GRK2 transfiziert. Vor der Stimulation mit 10 μM Isoproterenol erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit einem polyklonalen anti-YFP-Antikörper bei 37°C. (A und B) Arrestin-3-CFP und YFP-markierte Rezeptoren wurden mit hoher Laserintensität in einem kleinen Ausschnitt an der Plasmamembran geblichen (s. weiße Pfeile) und die Wiederkehr beider markierten Proteine wurde über den Zeitraum von mindestens 180 s bei niedrigen Laserintensitäten aufgenommen. Die Länge des Maßstabbalkens beträgt 1 μm. Die mittlere Wiederkehr von Arrestin-3 (C) oder YFP-markierten Rezeptoren (D) wurde berechnet (n=17-23). Die schnelle sowie die langsame Komponente der Arrestin-3-Wiederkehr wurden mit Hilfe einer biexponentiellen Gleichung (s. 2.2.4.2) bestimmt. Die mittlere Wiederkehr und die korrespondierenden Halbwertszeiten sind in **Tabelle 3.2** zusammengefasst. (E) Langsame Komponente der Wiederkehr ($k_{slow} \pm S.E.M.$) *** $P < 0,001$; ANOVA mit nachfolgendem Dunnetts multiplen Vergleichstest. (F) Die Wiederkehr des YFP-β2AR wurde ohne Antikörperbehandlung bestimmt.

Tabelle 3.2: Zeitkonstanten und Anteil der mobilen Fraktionen aus FRAP-Experimenten
Die kinetischen Parameter der schnellen und langsamen Wiederkehr (k_{fast} und k_{slow}) wurden mittels einer biexponentiellen Funktion (s.2.2.4.2) ermittelt. Halbwertszeiten (HWZ) wurden mit $\ln 2/k$ berechnet.

FRAP konfokal	Arr-3 Wiederkehr \pm S.E.M (%)	$k_{\text{fast}} \pm$ S.E.M. (s^{-1})	$k_{\text{slow}} \pm$ S.E.M. (s^{-1})	schnelle HWZ (s)	langsame HWZ (s)
$\beta 2\text{AR}$	$54,6 \pm 2,6$	$0,185 \pm$ $0,015$	$0,019 \pm 0,001$	3,8	36,5
$\beta 2\text{AR SSS}$	$51,3 \pm 5,1$	$0,085 \pm$ $0,017$	$0,012 \pm 0,001$	8,2	57,8
$\beta 2\text{V2R}$	$21,3 \pm 2,7$	$0,143 \pm$ $0,038$	$0,006 \pm 0,001$	4,9	115,5

3.1.12 Die Rezeptorphosphorylierung determiniert den zellulären Arrestin-3 Transport

Anschließend wurde untersucht, ob das Einfügen zusätzlicher phosphorylierbarer Serine in den $\beta 2$ -adrenergen C-Terminus die Lokalisation von Arrestin-3 nach Rezeptorstimulation beeinflusst. Der C-terminal mit YFP markierte $\beta 2\text{AR}$, $\beta 2\text{AR SSS}$ oder $\beta 2\text{V2R}$ wurde mit Isoproterenol stimuliert, was in allen Fällen die Rezeptorinternalisierung verstärkte (**Abbildung 3.16** Mitte). Nach 30 min Stimulation des Wildtyprezeptors war Arrestin-3 entweder an der Plasmamembran lokalisiert oder wieder im Cytosol zu beobachten (**Abbildung 3.16** A oben). Hingegen war Arrestin-3 nach Stimulation des $\beta 2\text{AR SSS}$ oder $\beta 2\text{V2R}$ in intrazellulären Vesikeln vorzufinden (**Abbildung 3.16** A Mitte). Das Ausmaß der Kolokalisation zwischen Arrestin und Rezeptoren wurde mit Hilfe des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten bestimmt (**Abbildung 3.16** B). Hieraus ergab sich, dass die Kolokalisation zwischen Arrestin und $\beta 2\text{AR SSS}$ sowie $\beta 2\text{V2R}$ gegenüber der zwischen $\beta 2\text{AR}$ und Arrestin erheblich verstärkt war. Unstimulierte Rezeptoren zeigten wenig Kolokalisation mit Arrestin-3. Um die Arrestinlokalisierung an den verschiedenen Rezeptoren näher zu charakterisieren wurde der $\beta 2\text{AR}$ oder der $\beta 2\text{AR SSS}$ bzw. der $\beta 2\text{V2R}$ ohne Fluorophormarkierung zusammen mit markiertem Arrestin und markiertem EEA1 untersucht. EEA1 ist ein frühendosomal Marker, der an endosomalen Sortier- und Fusionsvorgängen beteiligt ist (Stenmark *et al.*, 1996; Mishra *et al.*, 2010). Die Stimulation des $\beta 2\text{AR}$ mit $10 \mu\text{M}$ Isoproterenol resultierte in der Translokation von Arrestin-3 an die Plasmamembran. Dies blieb über den Beobachtungszeitraum von 30 min entweder unverändert oder die Rückverteilung von Arrestin-3 ins Cytosol konnte beobachtet werden

(**Abbildung 3.17 A** oben). Dagegen verursachte die Stimulation des $\beta 2AR$ SSS sowie die des $\beta 2V2R$ die Arrestinrekrutierung in EEA1-positive Kompartimente (**Abbildung 3.17 A** Mitte und unten). Die Quantifizierung der Kolo­kalisation von Arrestin-3 mit $\beta 2AR$ SSS oder $\beta 2V2R$ ergab signifikante Unterschiede verglichen mit dem $\beta 2AR$ (**Abbildung 3.17 B**). Um zu klären, ob das Kontrollkonstrukt $\beta 2AR$ 5S (**Abbildung 3.1**) endosomale Kolo­kalisation mit Arrestin-3 zeigt, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt. Nach 30-minütiger Stimulation mit Isoproterenol konnte nur wenig Überlappung zwischen Arrestin und EEA1 am $\beta 2AR$ 5S beobachtet werden (**Abbildung 3.18**). Dies deutet darauf hin, dass für die endosomale Rezeptorkolo­kalisation von Arrestin das volle Muster an Serinen und Threoninen zusätzlich zum eingefügten SSS Cluster im proximalen C-Terminus des $\beta 2$ -adrenergen Rezeptors erforderlich ist.

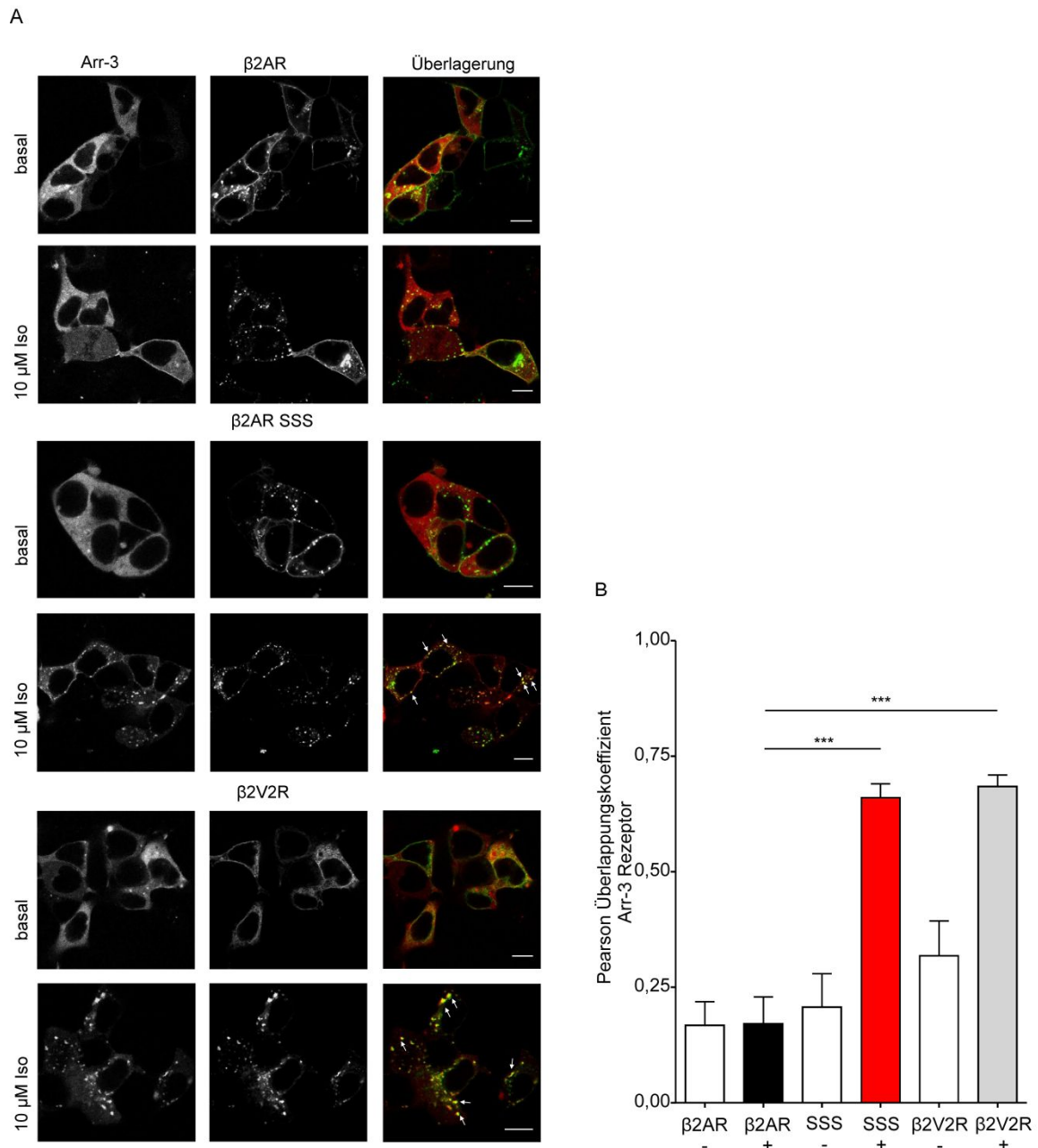


Abbildung 3.16: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 mit dem β 2AR, β 2AR SSS, und β 2V2R
 (A) Transient mit den genannten Rezeptoren und Arrestin-3-CFP (Arr-3) sowie GRK2 transfizierte HEK293T-Zellen wurden 30 min mit 10 μ M Isoproterenol bei 37°C stimuliert, fixiert und mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes visualisiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Unter basalen Bedingungen waren der β 2AR, β 2AR SSS, oder der β 2V2R überwiegend an der Plasmamembran und Arrestin-3 cytosolisch lokalisiert. Nach der Behandlung mit Isoproterenol waren die Rezeptoren als punktierte Strukturen an der Plasmamembran oder im Cytosol zu finden. Mit Rezeptoren kolokalisiertes Arrestin-3 war nach Überlagerung der Aufnahmen als gelbe Punkte (s. weiße Pfeile) zu erkennen. (B) Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde für die Überlappung zwischen Arrestin-3-CFP und YFP-markierten Rezeptoren vor (-) $n \geq 8$ und nach (+) $n \geq 7$ Stimulation berechnet (Mittelwert \pm S.E.M.). *** $P < 0,001$ ANOVA, mit anschließend durchgeführtem multiplen Bonferroni Vergleichstest.

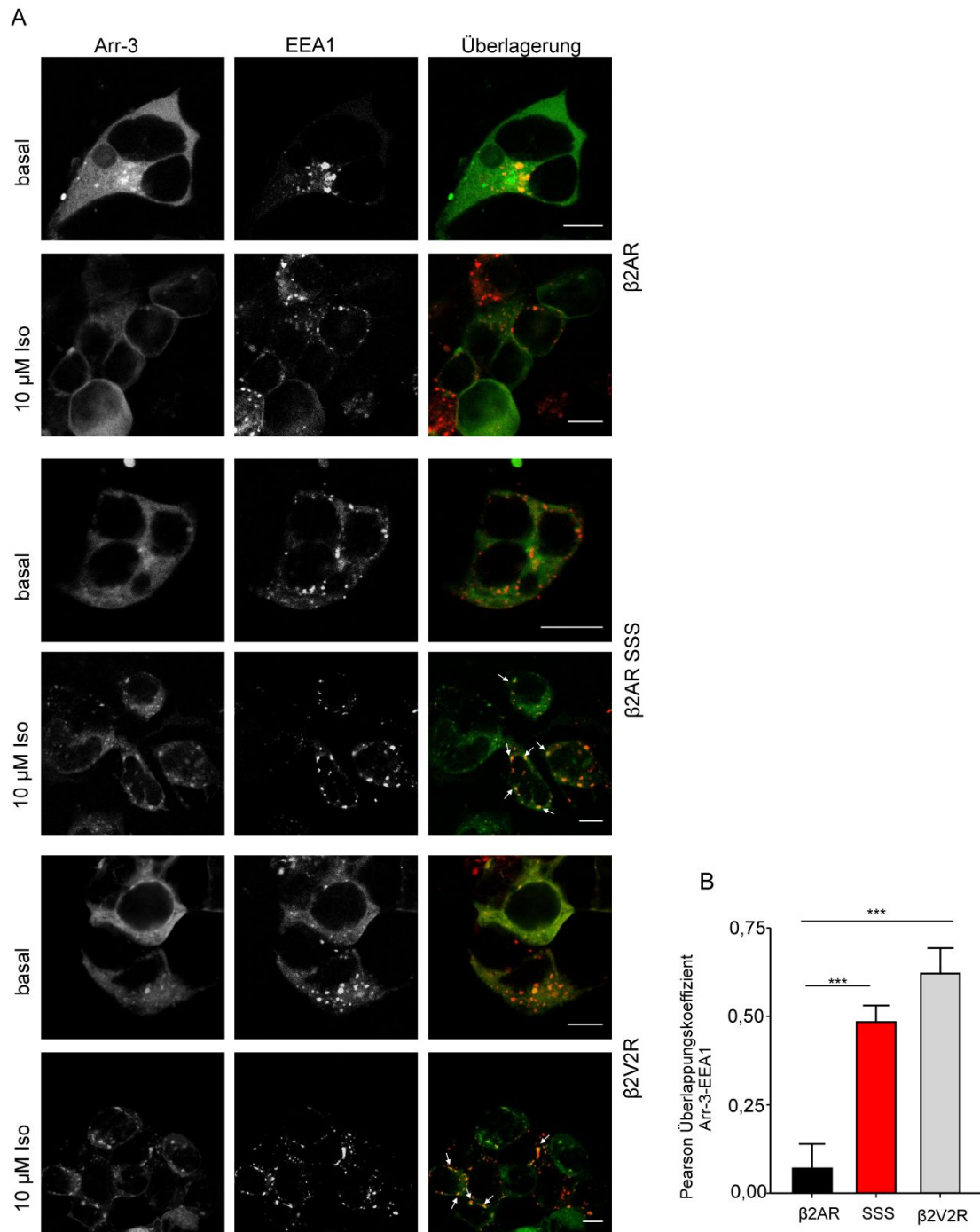


Abbildung 3.17: Kolokalisation von Arrestin-3 mit EEA1 nach $\beta 2AR$, $\beta 2AR$ SSS, und $\beta 2V2R$ Stimulation (A) Konfokale Aufnahmen von HEK293T-Zellen, welche die genannten Rezeptoren sowie GRK2, Arrestin-3-CFP (Arr-3) und mCherry-EEA1 transient exprimierten. (B) Unbehandelte oder mit 10 μM Isoproterenol stimulierte Zellen wurden fixiert und auf Kolokalisation zwischen Arrestin-3-CFP und mCherry-EEA1 untersucht (n=7-10), Mittelwert \pm S.E.M. ***P<0,001, ANOVA mit Bonferronis multiplem Vergleichstest. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

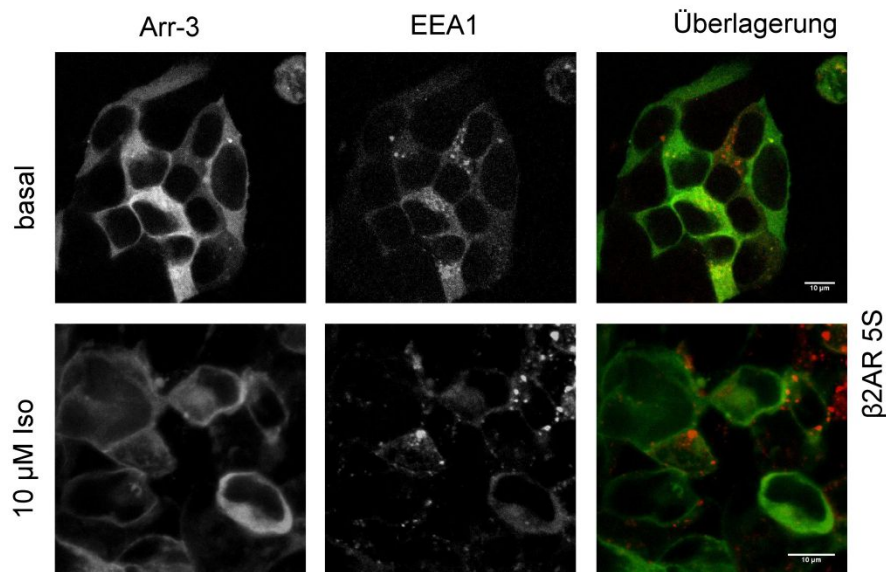


Abbildung 3.18: Lokalisation von Arrestin-3 und EEA1 am β 2AR 5S HEK293T-Zellen, die transient Arrestin-3-CFP, β 2AR 5S und GRK2 exprimierten, wurden entweder unbehandelt oder nach 30-minütiger Stimulation mit 10 μ M Isoproterenol bei 37°C fixiert und auf Kolo-kalisation zwischen Arrestin und EEA1 konfokalmikroskopisch untersucht. Endosomale Arrestin-3-Rekrutierung war mit diesem Rezeptor nicht feststellbar. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

3.1.13 Agonist-induzierte Rezeptorinternalisierung und Recycling nach Entfernen des Agonists

Es wurde ein Internalisierungsassay durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob die verstärkte Arrestinaffinität gegenüber dem SSS-Cluster im proximalen C-Terminus des β 2-adrenergen Rezeptors mit veränderter Rezeptorinternalisierung assoziiert ist. Die ligandenabhängige Internalisierung des β 2AR ist ein arrestin-abhängiger Prozess, weshalb überprüft werden sollte, ob ein Rezeptor, welcher die Möglichkeit besitzt, stärker mit Arrestin zu interagieren, Veränderungen im Internalisierungsverhalten aufweist. Wie in **Abbildung 3.19 A** gezeigt, internalisierte der β 2AR SSS stärker ($30 \pm 4,5 \%$) als der Wildtyprezeptor ($13 \pm 4,6 \%$) nach 30-minütiger Behandlung mit 1 μ M Isoproterenol. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Wildtyprezeptor in Abwesenheit von überexprimierten Arrestin bereits publiziert (Kim and Benovic, 2002). Nach 30-minütiger Stimulation wurde der Agonist durch wiederholtes Waschen der Zellen entfernt und das Recycling der Rezeptoren wurde bei 37°C für die angegebenen Zeitpunkte (**Abbildung 3.19**) ermöglicht. Sowohl der Wildtyp als auch der β 2AR SSS zeigten eine schnelle Recyclingrate von etwa 60 % innerhalb von 30 min. Ähnliche Recyclingraten für den Wildtyprezeptor wurden bereits zuvor beobachtet (Gage *et al.*, 2001).

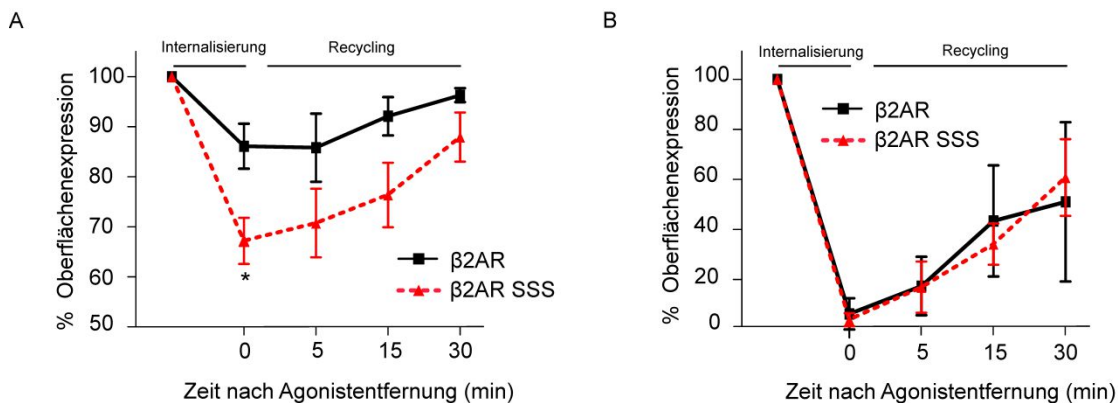


Abbildung 3.19: Agonist-induzierte Rezeptorinternalisierung und Recycling nach Entfernen des Agonists (A) HEK293T-Zellen wurden transient mit $\beta 2AR$ oder $\beta 2AR$ SSS transfiziert und 30 min mit 1 μM Isoproterenol bei 37°C stimuliert. Die Internalisierung des $\beta 2AR$ SSS nach 30 min war signifikant verschieden vom $\beta 2AR$; * $P < 0,05$; t-Test nach Student. Nach Entfernen des Liganden auf Eis wurde das Recycling der Rezeptoren für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C ermöglicht. Die Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. Die Daten repräsentieren das Mittel der an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren \pm S.E.M. normiert auf das Maximum der Expression vor Rezeptorstimulation ($n=3$). (B) Um die Kinetik des Recyclings zu vergleichen, wurde die Wiederkehr des $\beta 2AR$ oder $\beta 2AR$ SSS an die Plasmamembran auf die Rezeptoroberflächenexpression vor der Stimulation als Maximum und auf das individuelle Minimum nach der Rezeptorinternalisierung normiert. Diese Daten wurden von Dr. Cornelius Krasel generiert und ausgewertet.

3.1.14 Nachgeschaltete Signalwege

Die Internalisierung von Arrestin-Rezeptorkomplexen hat nicht nur zur Folge, dass Rezeptoren entweder in den Zyklus der Degradation oder des Recyclings eingeschleust werden, sondern induziert auch neue intrazelluläre Signalkaskaden. In diesem Zusammenhang wurde von der arrestin-abhängigen Aktivierung von ERK1/2 berichtet (Shenoy *et al.*, 2007). Insbesondere Rezeptoren, die stabile Komplexe mit Arrestin bilden können, scheinen ERK1/2 über einen längeren Zeitraum zu aktivieren als Rezeptoren, die nur transient mit Arrestin interagieren (Tohgo *et al.*, 2003). Um der Frage nachzugehen, ob die Stimulation des $\beta 2AR$ SSS die Aktivität endogener MAPK beeinflusst, wurde die Phosphorylierung von ERK 1/2 mittels Western-Blot bestimmt. **Abbildung 3.20** zeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der MAPK-Aktivität nach Aktivierung des $\beta 2AR$ oder $\beta 2AR$ SSS bestand. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass anfängliche Experimente in stabil transfizierten HEK293-Zellen zunächst anhaltende ERK1/2 Phosphorylierung zeigten, im Verlauf weiterer Experimente schwankten die Resultate jedoch stark. Verschiedene experimentelle Bedingungen z. B. unterschiedlich lange Hungerzeiten der Zellen, die Verwendung stabil oder transient transfizierter HEK293-Zellen oder ein Wechsel der Zelllinie zu COS-7 Zellen, führten nicht zu eindeutigen Resultaten. Die optimalen Bedingungen zur Messung der MAPK-Aktivität wurden nicht erreicht.

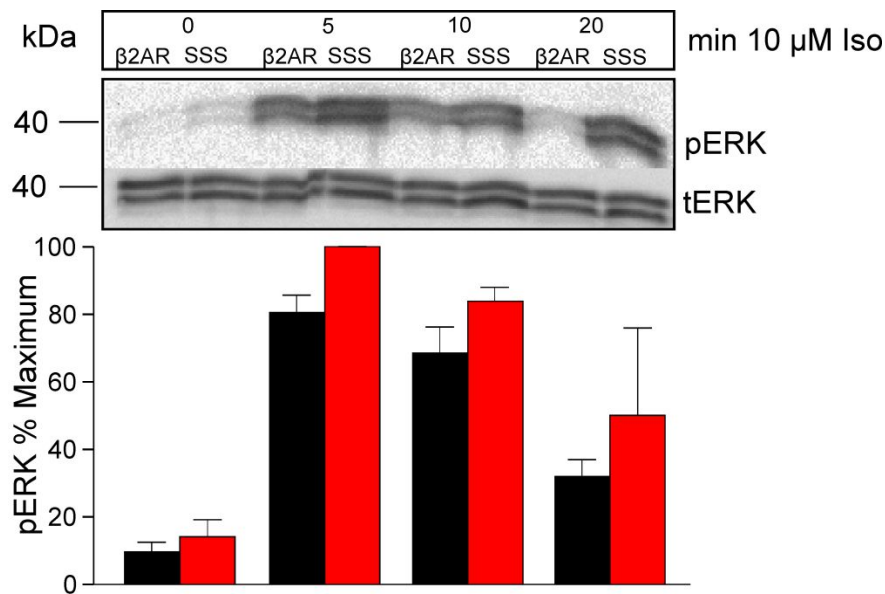


Abbildung 3.20: MAPK Aktivität vor und nach Stimulation des β2AR oder β2AR SSS Stabil mit β2AR oder β2AR SSS transfizierte HEK293-Zellen wurden nach 3-maligem Waschen mit serumfreiem DMEM drei Stunden in serumfreiem DMEM inkubiert und anschließend wie angegeben stimuliert. MAPK Aktivität wurde mittels Westernblot bestimmt. Oberer Blot: Anteil an phospho-ERK1/2; unterer Blot: totale ERK-Level.

Mit Hilfe von biochemischen Ansätzen wurde gezeigt, dass Arrestin der agonistabhängigen Ubiquitinierung unterliegt und über das Ausmaß und die Dauer der Arrestininteraktion mit Rezeptoren zu bestimmen scheint (Shenoy und Lefkowitz, 2003). Um die Rolle der Arrestin-Ubiquitinierung für die Rezeptoraffinität zu untersuchen, wurde zunächst der Versuch unternommen, einen FRET-Assay zwischen verschiedenen markierten Ubiquitin-sowie Rezeptorvarianten zu etablieren. Dieser Versuch resultierte jedoch nicht in detektierbaren, ligandenabhängigen FRET- Signalanstiegen (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss der Arrestin-Ubiquitinierung dennoch zu untersuchen, wurde ein Arrestin-3-Ubiquitin-YFP-Fusionsprotein eingesetzt, welches zuvor beschrieben wurde (Shenoy und Lefkowitz, 2003). Im Gegensatz zum Wildtyp-Arrestin-3 endozytiert das mit Ubiquitin fusionierte Arrestin-3 mit dem stimulierten β2-adrenergen Rezeptor (Shenoy und Lefkowitz, 2003). Dieser Befund suggeriert, dass die Rezeptoraffinität des ubiquitinierten Arrestins erhöht ist. FRET-Messungen zwischen β2AR-CFP und Arr-3-UQ-YFP lieferten jedoch heterogene Ergebnisse. Während sieben von zehn gemessenen Zellen ein Dissoziationsverhalten aufwiesen, das dem Wildtyp-Arrestin-3 sehr ähnlich war (**Abbildung 3.21 C**), so zeigten drei Zellen eine geringere Auswaschrage, welche verglichen mit dem Großteil der Messungen verlangsamt verlief (**Abbildung 3.21 D**). Insgesamt war die Dissoziationsrate des mit Ubiquitin fusionierten Arrestins gegenüber dem Wildtyp-Arrestin-3 am β2-adrenergen Rezeptor leicht signifikant verlangsamt

(**Abbildung 3.21 B**). An dieser Stelle ist zu bemerken, dass einige Zellen welche mit Arrestin-3-UQ-YFP transfiziert waren, keinen ligandenabhängigen Anstieg im FRET-Signal aufwiesen, diese Zellen sind nicht in die Gesamtauswertung miteingeflossen. Arrestin-Ubiquitin-YFP bildet bereits in unstimulierten Zellen starke Aggregate und interagiert konstitutiv mit Komponenten der Endozytosemaschinerie (Shenoy *et al.*, 2007). Die Übertragung von Ubiquitin erfolgt normalerweise enzymkatalysiert. Dabei wird eine Peptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einem Lysin im Zielprotein gebildet (Pickart, 2001). Möglicherweise kann die Beobachtung der stimulusunabhängigen Aggregatbildung von Arrestin-Ubiquitin-YFP auf die artifizielle Verknüpfung zwischen Arrestin und Ubiquitin zurückgeführt werden. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Fusionsproteine der unspezifischen Proteolyse unterliegt, sodass Arrestin-3-YFP statt Arrestin-3-Ubiquitin-YFP vorliegt. Dies würde die heterogenen Ergebnisse in FRET-Messungen erklären. Aufgrund der artifiziellen Verknüpfung und der konstitutiven Aggregatbildung eignet sich die Arrestin-Ubiquitin-Chimäre nicht zur Untersuchung der stimulusabhängigen Ubiquitinierung von Arrestin.

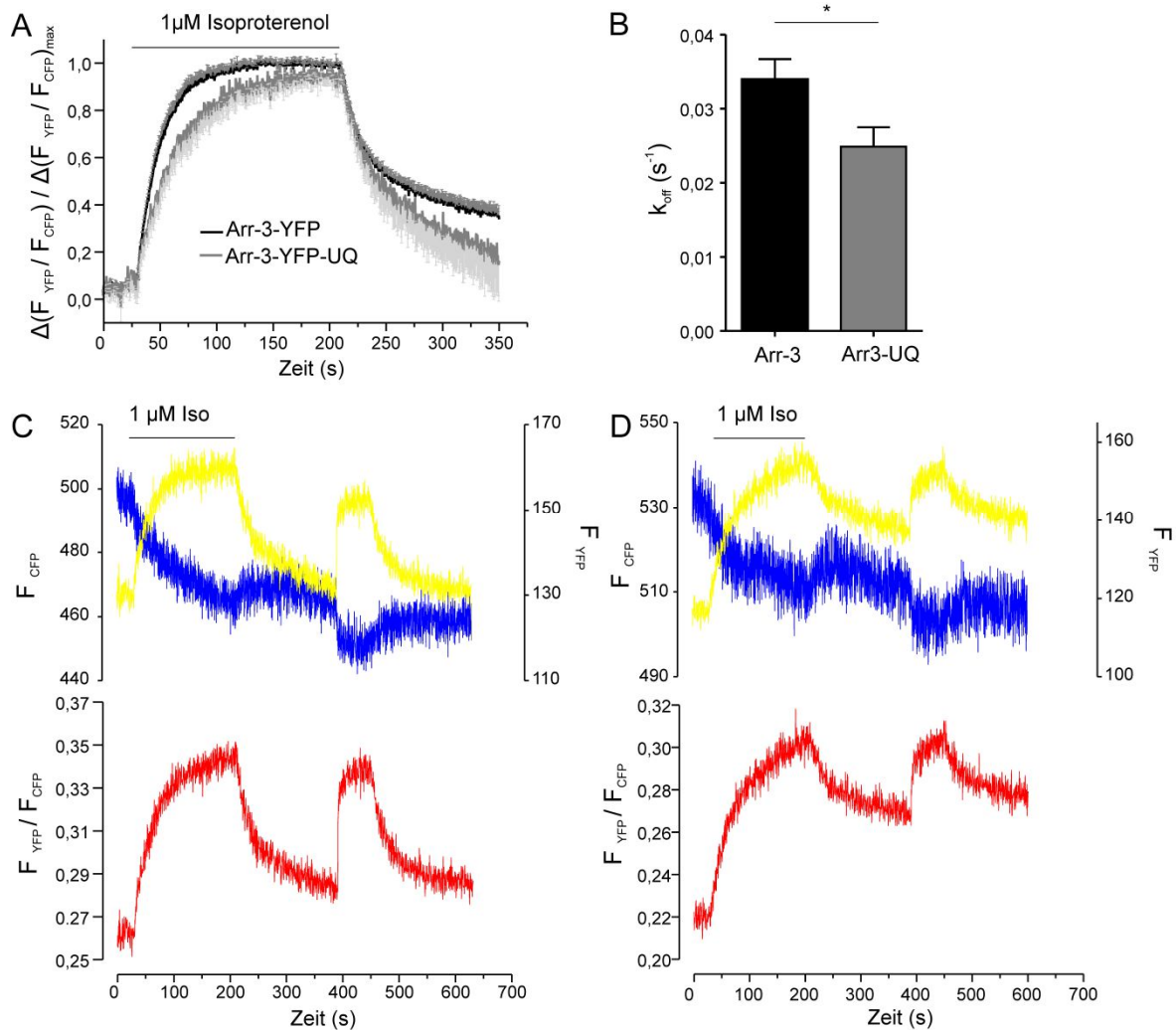


Abbildung 3.21: Interaktion eines Arrestin-3-Ubiquitininfusionsproteins mit β 2-adrenergen Rezeptoren (A) Die Daten der Interaktion von Arrestin-3 oder Arrestin-3-Ubiquitin mit dem β 2AR wurden zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der Normierungen auf die individuellen FRET Änderungen der Einzelmessungen; zur besseren Visualisierung sind die Standardfehler nur in einer Richtung aufgetragen. HEK293T-Zellen wurden transient mit Arrestin-3-YFP oder Arrestin-3-YFP-Ubiquitin, GRK2 und mit C-terminal mit CFP markierten β 2-Rezeptoren transfiziert. Die Dynamik der Arrestin-3-Interaktionen wurde mittels FRET bestimmt. Die Zellen wurden mit Pufferlösung (Tyrode) 30 s lang perfundiert, dann erfolgte 180 s lang die Applikation von 1 μ M Isoproterenol in FRET Puffer, gefolgt von 180 s Auswaschen mit FRET Puffer. (B) Die Zeitkonstante der Arrestindissoziation (k_{off}) nach Auswaschen des Liganden wurde durch eine monoexponentielle Anpassung bestimmt (Arrestin-3:n=7; Arrestin-3-Ubiquitin: n=10). $p < 0,036$, t-Test nach Student. (C) Beispiel für eine schnelle und (D) Beispiel für eine langsame Auswaschkinetik von Arrestin-3-Ubiquitin am β 2AR. Oben: FRET-Einzelspuren, unten: FRET-Ratio, F_{YFP}/F_{CFP} .

3.2 Identifikation ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen im humanen PTHR1 und Untersuchung von deren funktioneller Relevanz

3.2.1 Phosphoproteomanalyse des humanen PTHR1

Der humane Parathyroidhormonrezeptor PTHR1 (im Folgenden als PTHR bezeichnet) weist insgesamt 90 Serine, Threonine und Tyrosine als mögliche Phosphorylierungsstellen auf. Davon liegen 39 Stellen in extrazellulären Bereichen des Rezeptors, 34 Stellen entfallen auf intrazelluläre Bereiche wovon sich 26 Stellen im C-Terminus und 8 Stellen in intrazellulären Schleifen (ICL, intracellular loops) befinden. Die genaue Lokalisation der Phosphorylierungsstellen im humanen PTHR sowie die Charakterisierung der funktionellen Bedeutung stehen jedoch bis heute aus. Um die Details der ligandenabhängigen Phosphorylierung dieses Rezeptors zu untersuchen, wurde eine auf Tandem-Massenspektrometrie basierende Phosphoproteomanalyse (MS/MS) durchgeführt. Dies ermöglichte teilweise die exakte Lokalisation von Phosphorylierungsstellen im Rezeptor. Zunächst wurden stabile Zelllinien mit dem humanen PTHR generiert. Es existiert bisher noch kein Radioligand, der unproblematisch einzusetzen ist, daher wurde die PTHR-Expression in verschiedenen monoklonalen Zelllinien durch Immunfluoreszenz ermittelt (**Abbildung 3.22**). Nach Bestätigung der Rezeptorexpression wurde der N-terminal mit einem HA-Epitop markierte PTHR nach 8-minütiger Stimulation mit 1 μ M hPTH 1-34 aus stabil transfizierten HEK293-Zellen isoliert und gereinigt (s. 2.2.3.8). Da mit der Phosphorylierung bestimmter Stellen innerhalb des C-Terminus von G-Proteingekoppelten Rezeptoren die definierte Interaktion mit Signalmolekülen sowie die spezifische zelluläre Signaltransduktion diskutiert wird (Krasel *et al.*, 2008; Tobin, 2008; Tobin *et al.*, 2008), lag der Fokus der MS/MS-Untersuchungen zunächst auf phosphorylierten Stellen innerhalb des C-Terminus. Die massenspektrometrische Proteomanalyse tryptischer Peptide des PTHR ergab eine Wiederfindungsrate zwischen 30 und 51 % (**Abbildung 3.30**, unterstrichen). Entscheidend war, dass hierbei 22 von 26 möglichen Phosphorylierungsstellen des PTHR-C-Terminus (V466-M593) miteingeschlossen waren. Wichtig für die Auswertung und Interpretation der Spektren ist, dass b-Ionen ausgehend vom N-Terminus des Peptids und y-Ionen ausgehend vom C-Terminus des Peptids gezählt werden (vgl Kapitel 3.1.2.). Für Phosphoserin 491 (**Abbildung 3.24**) bzw. Phosphoserin 519 (**Abbildung 3.23**) erfolgte die exakte Lokalisation durch die Erhöhung der Masse um + 80 Da an den entsprechenden Stellen im

Peptid. Die Zuordnung der beiden Phosphoserine 492 und 493 im Peptid 489-SGSSSYSYGPMVSHTSVTNVGPR-511 (**Abbildung 3.25**) erfolgte durch das Auftreten von b_5 reduziert um 196 m/z, was der Abspaltung von zwei Wasser- und zwei Phosphatmolekülen entspricht. Da das b_3 -Ion keine Hinweise auf abgespaltene Phosphatmoleküle lieferte, könnte daraus geschlossen werden, dass Serin 489 und Serin 491 in diesem Peptid nicht phosphoryliert waren. Jedoch ist die exakte Zuordnung der Phosphorylierungsstellen aufgrund der unzureichenden Fragmentierung dieses Peptids nicht möglich. Die potentiellen Phosphorylierungsstellen sind daher mit einem Stern gekennzeichnet. **Abbildung 3.26** zeigt erneut das Peptid 489-SGSSSYSYGPMVSHTSVTNVGPR-511. Hier konnten 7 aufeinanderfolgende Aminosäuren von n-terminaler Seite her identifiziert werden. Das Auftreten von $[y_8 - 98 \text{ Da}]$ bzw. $[y_9 - 196 \text{ Da}]$ deutet auf die Abspaltung einer bzw. zweier Phosphatgruppen an S504 und T503 hin. Das y_6 -Ion (T506) war nicht phosphoryliert. Das Peptid 540-(K)PGTPALETLETPPAMAAPK(D)-560 in **Abbildung 3.27** weist nur eine bruchstückhafte Abfolge von b-Ionen auf. Trotzdem konnte hier durch die Abspaltung eines Phosphats in dem internen Peptidfragment $[\text{PAETL} - 98 \text{ Da}]$ in Kombination mit $[b_8 - 98 \text{ Da}]$ die phosphorylierte Stelle Threonin 547 zugeordnet werden. Die Phosphorylierung von Threonin 551 ist in **Abbildung 3.28** dargestellt. Hier konnte durch $[y_9 - 98]$ die Phosphorylierung an entsprechender Stelle zugeordnet werden. Interessanterweise ergaben die MS/MS-Untersuchungen auch eine unerwartete Phosphorylierungsstelle im extrazellulär gelegenen N-Terminus des PTH-Rezeptors. Hier war Serin 73 im Peptid 68-(K)GWTSASTSGKPR(K)-79 phosphoryliert (**Abbildung 3.29**). Alle Phosphorylierungsstellen, die durch MS/MS nachgewiesen werden konnten, sind in **Abbildung 3.30** zusammengefasst. Die Zuordnung der Peptidfragmente zu den Durchschnittsmassen der Aminosäuren kann mit Hilfe von Tabelle 3.7 im Ergebnisanhang nachvollzogen werden.

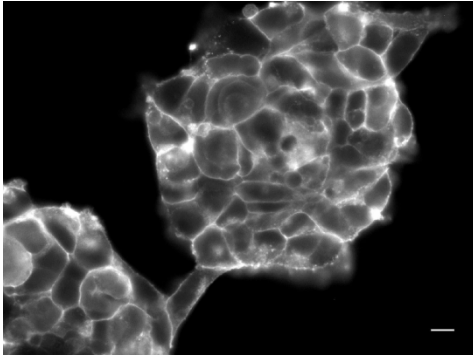


Abbildung 3.22: Expression des humanen HA-PTHRI in HEK293-Zellen
Epifluoreszenzaufnahme einer immunzytochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen HA-Epitope. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

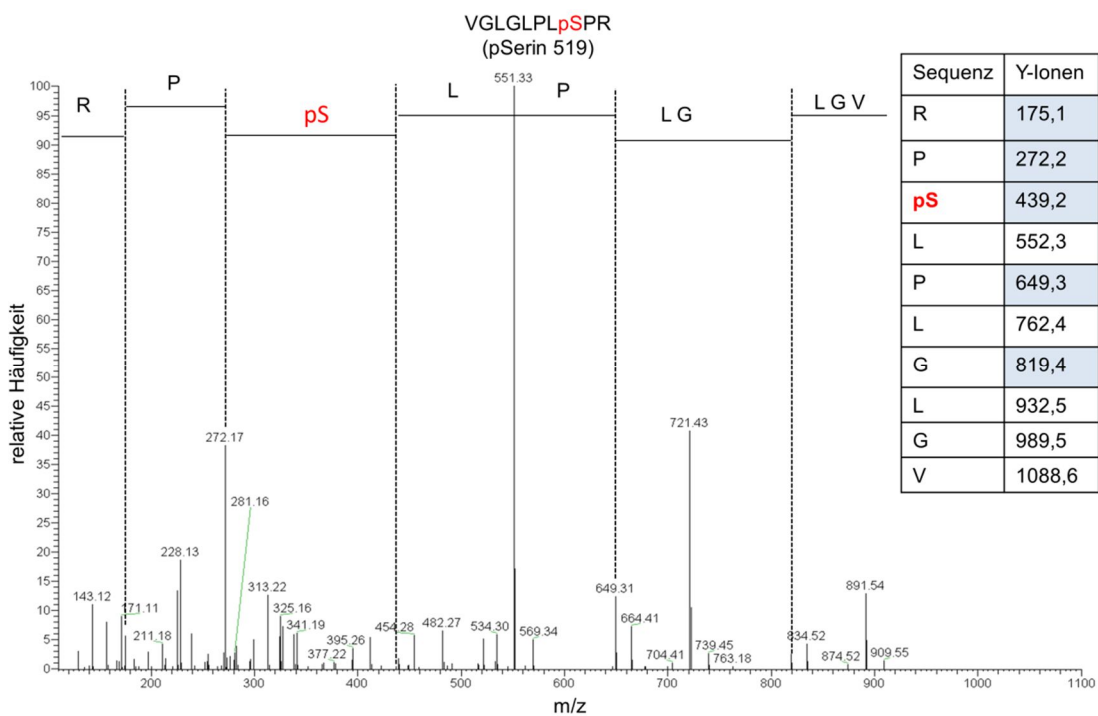


Abbildung 3.23: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)VGLGLPLSPR(L) aus dem humanen PTHR MS/MS Daten wurden mit der Datenbank UniProtKB / Swiss Prot mit Hilfe der Suchmaschine Mascot verglichen. Die relative Häufigkeit der Peptide wurde gegen (m/z) aufgetragen. Y-Ionen, welche aus der C-terminalen Spaltung des Peptids resultierten, sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau markiert in der Tabelle rechts angegeben. Die Erhöhung der Masse um 80 Da an S519 deutet auf die Phosphorylierung an dieser Stelle hin.

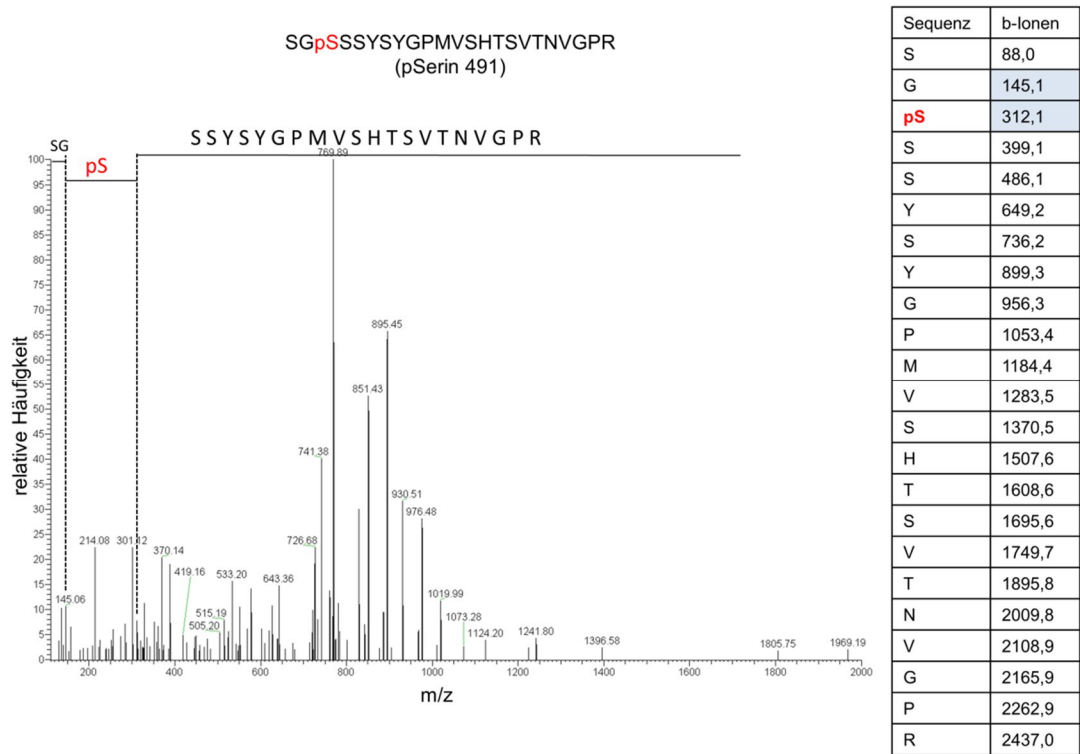


Abbildung 3.24: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)SGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPR(V) aus dem humanen PTHR Die relative Häufigkeit der Peptide ist gegen m/z aufgetragen. Die b-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. Die Erhöhung der Masse um 80 Da an Stelle 491 deutet auf die Phosphorylierung dieser Stelle hin.

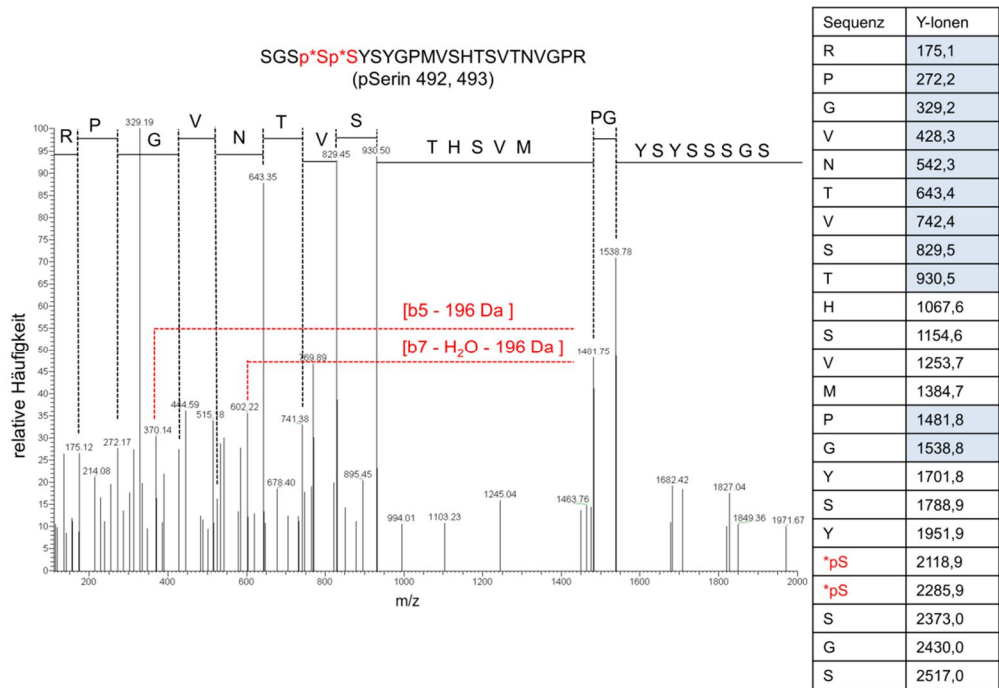


Abbildung 3.25: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)SGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPR(V) aus dem humanen PTHR Die relative Häufigkeit der Peptide ist gegen m/z aufgetragen. Die y-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. Die rot markierten b-Ionen, welche aus der Spaltung N-terminaler Peptidfragmente resultierten, [b5 - 196 Da] bzw. [b7-H2O-196 Da] deuten auf die Abspaltung von zwei Phosphatgruppen hin. Die potentiellen Phosphorylierungsstellen sind vor der Aminosäure mit einem Stern markiert.

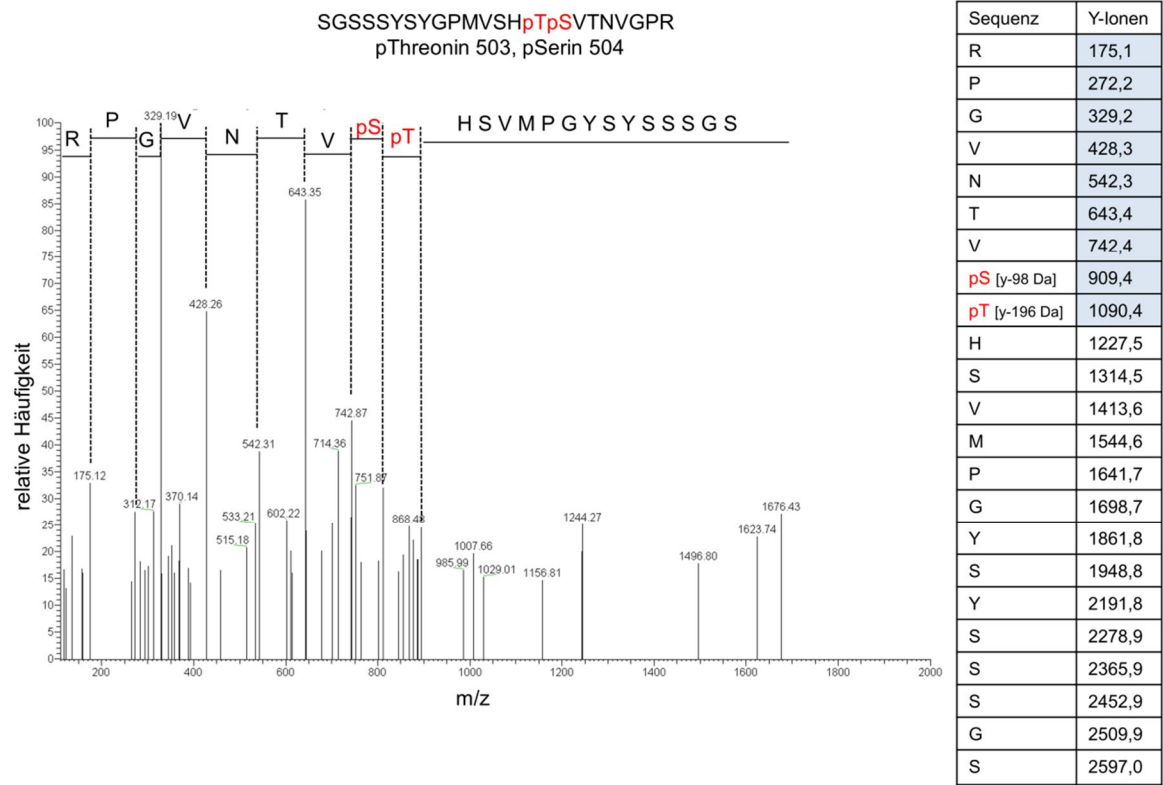


Abbildung 3.26: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)SGSSSYSGPMVSHpTpSVTNVGPR(V) aus dem humanen PTHR Die relative Häufigkeit der Peptide ist gegen m/z aufgetragen. Die y-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. [y8 – 98 Da] bzw. [y9 – 196 Da] deuten auf die Abspaltung einer bzw. zweier Phosphatgruppen an S504 und T503 hin.

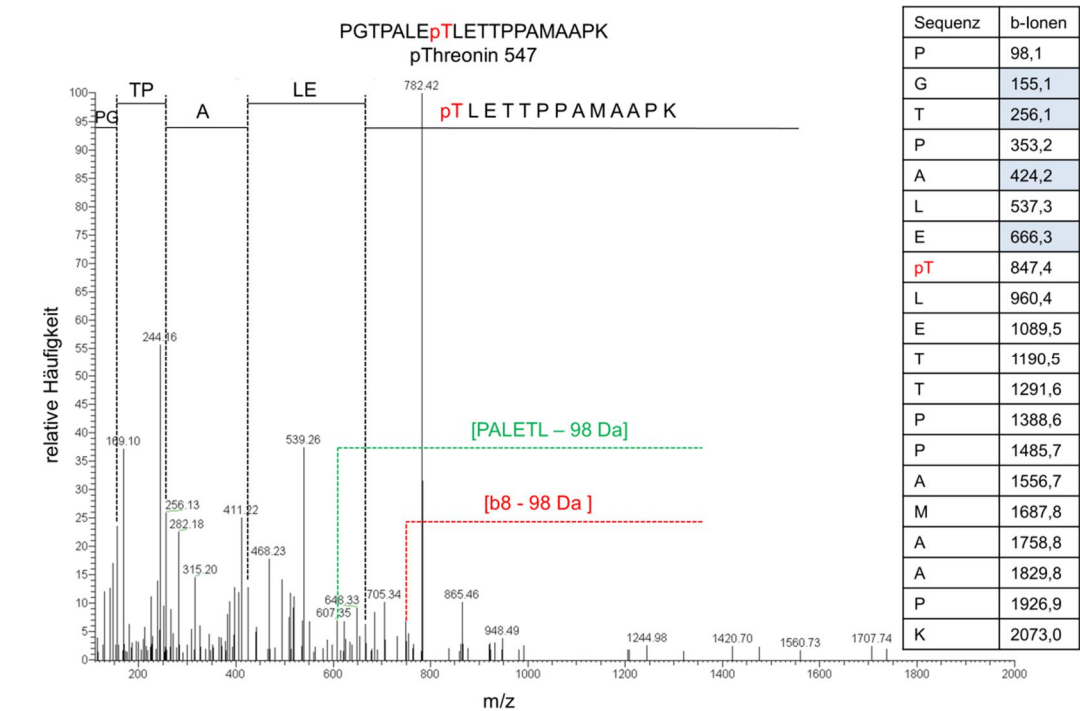


Abbildung 3.27: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (K)PGTPALEpTLETPPAMAAPK(D) aus dem humanen PTHR Die relative Häufigkeit der Peptide ist gegen m/z aufgetragen. Die b-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. Der Massenverlust von 98 Da im internen Fragment PALETL (grün) und im b8 Ion (rot) deuten auf die Phosphorylierung von Threonin 547 hin.

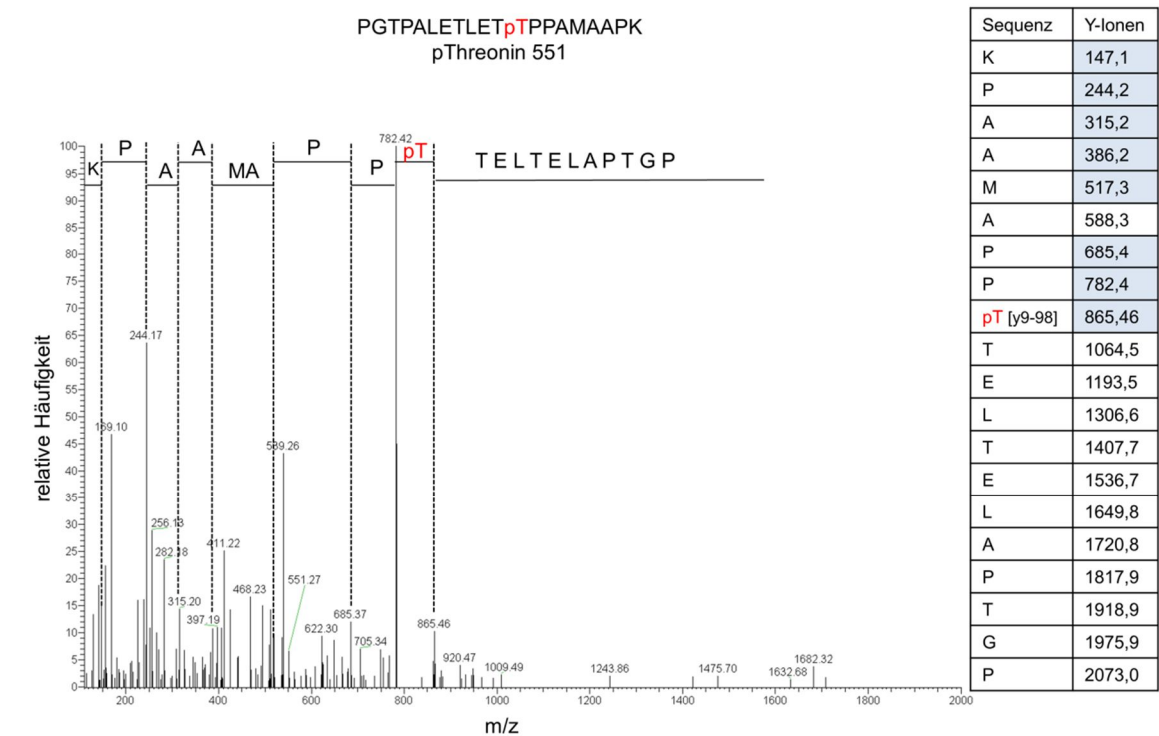


Abbildung 3.28: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (K)PGTPALETLETTPPAMAAPK(D) aus dem humanen PTHR Die relative Häufigkeit der Peptide ist gegen m/z aufgetragen. Die y-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. Der Massenverlust von 98 Da im y9-Ion ermöglicht den Rückschluss, dass Threonin 551 phosphoryliert war.

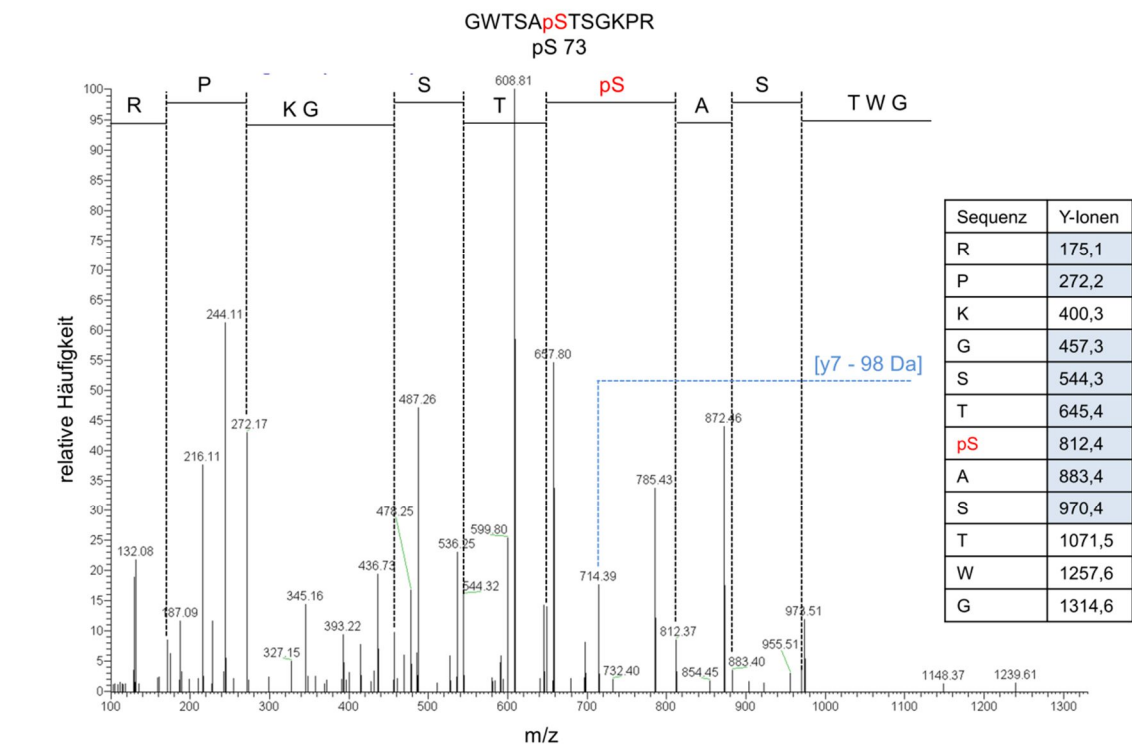


Abbildung 3.29: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (K)GWTSASTSGKPR(K) aus dem humanen PTHR Die relative Häufigkeit der Peptide ist gegen m/z aufgetragen. Die y-Ionen sind mit gestrichelten Linien markiert und hellblau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben. Die Erhöhung der Masse um 80 Da an Serin 73 lässt auf die Phosphorylierung an dieser Stelle schließen. Dies wird durch den Verlust der Masse von 98 Da an y-Ion 7 bestätigt.

Tabelle 3.3: **Zusammenfassung der Phosphopeptide des humanen PTHR** Es sind nur Peptide aufgeführt, deren korrekte Identität mit einer Wahrscheinlichkeit ≥ 95 % festgestellt wurde. Delta ppm gibt die mittlere Massengenauigkeit des jeweiligen Peptids an. Die Ergebnisse wurden aus drei separaten MS/MS Durchläufen erhalten. Phosphoserine deren Lokalisation nicht genau zugeordnet werden konnte, sind mit einem Stern markiert. Alle MS/MS Daten wurden in Kooperation mit der MRC Toxicology Unit in Leicester unter der Leitung von Prof. Andrew Tobin, Dr. Adrian Butcher und Dr. Andrew Bottrill generiert.

Peptidsequenz	Lokalisation	Mascot Ion Score	Delta ppm	Anzahl der Beobachtungen
GWTSa p STSGKPR	68-79	53,8	0,22	1
*p SWSRWTLALDKR	473-485	35,8	-2,2	1
SG p SSSYSYGPMVSHTSVTNVGPR	489-511	45,8	6,2	> 30
SGS *pS *pS YSYGPMVSHTSVTNVGPR	489-511	60,0	-1,9	> 20
SGSSSYSYGPMVSH pTp SVTNVGPR	489-511	38,1	-2,8	5
VGLGLPL p SPR	511-521	61,4	-2,2	> 20
PGTPALE p TLETPPAMAAPK	540-559	44,5	-1,4	1
PGTPALETLET p TPPAMAAPK	540-559	52,9	-1,7	5

1 MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYALVDADDVMTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVLQRP
 61 SIMESDKGWTS**a**STSGKPRKDKASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPCLPEDWHILCWPL
 121 GAPGEVAVPCPDYIYDFNHKGHAYRRCDRNGSWELVPGHNRTWANYSECVKFLTNETRE
 181 REVFDRGLMIYTVGYSVSLASLTVAVLILAYFRLHCTRN^{*}YIHMHLFLSFMLRAVSIFVK
 241 DAVLYSGATLDEAERL^{*}TEELRAIAQAPPPATAAGYAGCRVAVTFFLYFLATNYYWIL
 311 VEGLYLHSLIFMAFFSEKKYLWGFTVFGWGLPAVFVAVVWSVRATLANTGCWDLSSGNKK
 361 WIIQVPILASIVLNFI^{*}LVFINIVRLATK^{*}LR^{*}ETNAGRC^{*}DT^{*}RQ^{*}YR^{*}KLLKSTLVLMPLFGVH
 421 YIVFMATPYTEVSGTLWQVQM^{*}HYEMLFNSFQGF^{*}FVAIIYCFNGEVQAEIKK***S**WSRWTL
 481 ALDFKRKARSG**S****S****S**YSYGPMVSH**TS**VTNVGPRVGLGLPL**S**PRLLPTATTNGHPQLP
 541 GHAKPGTPALE**T**LET**T**PPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLOEEWETVM

Abbildung 3.30: **Zusammenfassung der ligandenabhängigen Phosphorylierungsstellen im humanen PTHR.** Die Wiederfindungsrate der Peptide des PTHR lag zwischen 30 und 51 %, (grau hinterlegt und unterstrichen). Phosphorylierte Serine und Threonine sind in rot dargestellt. Stellen, deren Phosphorylierung nicht exakt zugeordnet werden konnte, sind mit einem Stern vor der Aminosäure markiert.

3.2.2 Das Ausmaß der C-terminalen PTHR-Phosphorylierung unterscheidet sich abschnittsspezifisch

Um den Anteil der in Clustern auftretenden Phosphoserine- und Threonine am Gesamtanteil der Rezeptorphosphorylierung zu ermitteln, wurde der C-Terminus des PTHR abschnittsweise mutiert. Die zum Teil bereits aus MS/MS-Experimenten bekannten Phosphorylierungsstellen (s. Kapitel 3.2.1) innerhalb dieser Abschnitte wurden durch Alanine ersetzt, weshalb die Phosphorylierung an diesen Stellen aufgrund der fehlenden OH-Gruppe in der Aminosäure Alanin ausgeschlossen ist. In der Mutante PD1 waren alle fünf Serine von S489-S495 zu Alanin mutiert, in der Mutante PD2 wurden vier Serin- und Threoninreste zwischen S501 und T506 durch Alanine ersetzt, die Mutante PD3 vereinte

die Mutation der beiden genannten Abschnitte (**Abbildung 3.31**). Der stimulierte PTHR wies verglichen zu nicht stimulierten Rezeptoren nach 8-minütiger Inkubation mit 500 nM hPTH 1-34 einen robusten Anstieg der ^{32}P -Inkorporation auf (**Abbildung 3.32 A, oben**). Die Stimulation der PTHR Mutante PD1 führte verglichen mit dem PTHR zu einem signifikanten Rückgang der Phosphorylierung um $52,0 \pm 8,6 \%$ (SEM). Der Austausch der Phosphorylierungsstellen zwischen S501-T505 durch Alanin resultierte in der PTHR-Mutante PD2 und führte zur Reduktion der Phosphorylierung um $31,3 \pm 13,2 \%$ (SEM), welche verglichen mit der Gesamtphosphorylierung des PTHR nicht signifikant unterschiedlich war (**Abbildung 3.32**). Die Mutation aller Serine zwischen S489 und T506 (PD3, **Abbildung 3.32 A**) führte überraschenderweise lediglich zu einem Rückgang der Phosphorylierung um $56,4 \pm 9,7 \%$ (SEM). Daraus lässt sich einerseits schließen, dass weitere Serine und Threonine im distalen C-Terminus ligandenabhängig phosphoryliert werden können. Andererseits scheint das Motiv S501-T506 nur wenig Einfluss auf das Ausmaß der Gesamtphosphorylierung des PTHR zu nehmen, da die Reduktion der Phosphorylierung in der Kombinationsmutante PD3 nicht wesentlich verstärkt, sondern der in PD1 beobachteten Reduktion ähnlich war. In allen Experimenten wurde die Expression der verschiedenen PTH-Rezeptorkonstrukte durch einen Westernblot überprüft und als vergleichbar eingestuft. In früheren Studien wurden S473, S475, sowie S491 als potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen identifiziert (Blind *et al.*, 1996). Um die Phosphorylierung durch PKA an den Stellen S473 und S475 bzw. S491 zu verhindern, wurde in den Experimenten der PKA Inhibitor KT 5720 verwendet. Daher kann die beobachtete Phosphorylierung als Resultat der PKC- bzw. GRK-vermittelten Phosphorylierung betrachtet werden. Sequenzanalysen des PTHR-C-Terminus lassen aber den Schluss zu, dass noch weitere Kinasen wie z. B. CDK4 oder MAPK beteiligt sein könnten (Ubersax und Ferrell Jr, 2007).

PTHR

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKARSGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR S473A, S475A

464 GEVQAEIKK~~A~~~~A~~RWTLALDFKRKARSGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR PD1

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKAR~~A~~~~G~~~~A~~~~A~~~~A~~~~Y~~YGPMVSHTSVTNVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR PD2

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKARSGSSSYSGPMV~~A~~~~H~~~~A~~~~A~~~~V~~~~A~~NVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR PD3

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKAR~~A~~~~G~~~~A~~~~A~~~~A~~~~Y~~YGPMV~~A~~~~H~~~~A~~~~A~~~~V~~~~A~~NVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR PD5

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKAR~~A~~~~G~~~~A~~~~A~~~~A~~~~Y~~YGPMV~~A~~~~H~~~~A~~~~A~~~~V~~~~A~~NVGPRVGLGLPLSPRLLP~~A~~~~A~~~~A~~NGHPQLPGHA 538
 539 KPG~~A~~PALE~~A~~LE~~A~~A~~A~~PPAMAAPKDDGFLNG~~A~~C~~A~~GLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR PD3, S519A

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKAR~~A~~~~G~~~~A~~~~A~~~~A~~~~Y~~YGPMV~~A~~~~H~~~~A~~~~A~~~~V~~~~A~~NVGPRVGLGLPL~~A~~PRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

PTHR T503A, S504A

464 GEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKARSGSSSYSGPMVSH~~A~~~~A~~VTNVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHA 538
 539 KPGTPALETLETTPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM 593

Abbildung 3.31: Sequenzen verwendeter PTHR-Konstrukte Gezeigt wird der C-Terminus nach Cys-462, welches vermutlich palmitoyliert wird und das Ende der intrazellulären Helix 7 darstellt.

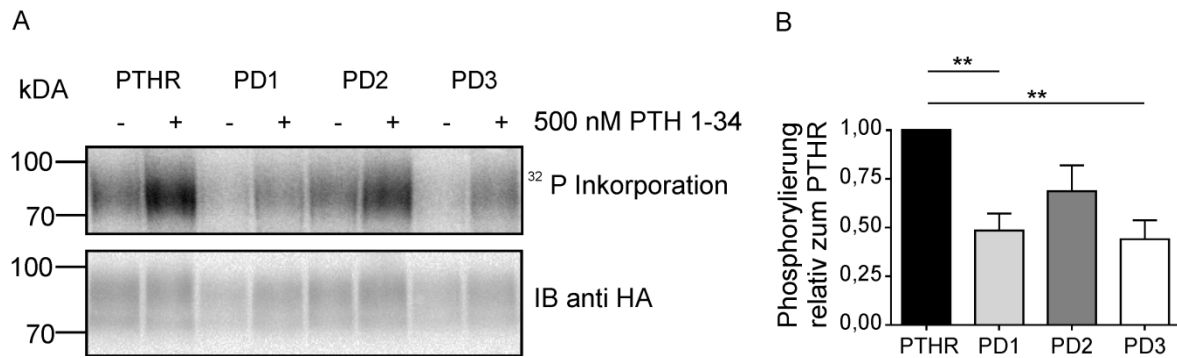


Abbildung 3.32: ³²P Inkorporation nach Stimulation mit hPTH 1-34 (A) HEK293T-Zellen, die transient mit HA-PTHR, HA-PTHR PD1, HA-PTHR PD2 oder HA-PTHR PD3 transfiziert waren, wurden 60 min mit dem PKA-Inhibitor KT 5720 präinkubiert. Dann wurden die Zellen 8 min mit 500 nM hPTH 1-34 stimuliert, lysiert, immunpräzipitiert und phosphorylierte Proteine wurden durch Autoradiographie visualisiert (A oben). Die Rezeptorexpression wurde mittels Westernblot bestimmt (A unten). (B) Quantifizierung der agonist-induzierten Phosphorylierung wie unter A gezeigt. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten dar. * $P < 0,05$; ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's multiplen Vergleichstest gegen den PTHR als Kontrolle. ** $P < 0,01$ PTHR vs. PD3, PTHR vs. PD 2 n.s.

3.2.3 Analyse der funktionellen Bedeutung von Phosphorylierungsstellen im PTHR

Der Opossum-PTHR zeigt eine robuste Interaktion mit Arrestin-3 bzw. Arrestin-2 (Vilardaga *et al.*, 2001, 2002). Um die funktionelle Rolle des humanen PTHR-C-Terminus genauer zu charakterisieren, wurde das Ausmaß der Arrestin-3-Interaktion und Translokation an verschiedene PTHR-Konstrukte untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Mutanten, deren C-terminale Serine und Threonine abschnittsweise oder einzeln zu Alanin mutiert waren, für FRET- und Translokationsmessungen eingesetzt (**Abbildung 3.31**). Der PTHR mit unverändertem C-terminalem Muster an Serinen und Threoninen zeigte eine ausgeprägte Interaktion mit Arrestin-3, die sich durch eine FRET-Änderung von $25,9 \pm 1,4$ % nach Stimulation mit 100 nM hPTH 1-34 auszeichnete (**Abbildung 3.33 A, B**). Der PTHR in welchem die potentiellen PKA-Stellen (Blind *et al.*, 1996) phosphorylierungsdefizient waren (PTHR S473A,S475A, **Abbildung 3.31**) wies gegenüber dem wildtypischen Rezeptor keine Veränderungen im Ausmaß der Arrestin-3-Interaktion auf (**Abbildung 3.33**). Dies legt nahe, dass die PKA-vermittelte Phosphorylierung des PTHR eine untergeordnete Rolle für die Arrestinaktivierung und -Interaktion spielt. Quantitative Analysen zeigten, dass die Phosphorylierung zwischen S489 und S495 mehr als 50 % zur agonist-vermittelten, PKA-unabhängigen Phosphorylierung beitragen (**Abbildung 3.32**). Daher wurde vermutet, dass die PTHR-Mutante PD, in welcher S489-S495 zu Alanin mutiert waren, nur eingeschränkt mit Arrestin interagieren kann. Tatsächlich wies der PTHR PD1 eine gegenüber dem

Wildtyprezeptor um etwa 45 % reduzierte Interaktion mit Arrestin-3 in FRET-Messungen auf. Bemerkenswert jedoch war, dass der PTHR PD2, welcher die agonist-vermittelte Gesamtphosphorylierung des Rezeptors nur um 30 % reduzierte, das Ausmaß der Arrestin-3-Interaktion um 60 % einschränkte (vgl. **Abbildung 3.32** mit **Abbildung 3.33** A,B). Hieraus lässt sich schließen, dass S501-T506 im PTHR eine bedeutende Rolle für die Arrestinbindung am PTHR spielen, aber weniger entscheidend für die totale Phosphorylierung des Rezeptors sind. Um zu analysieren, ob die beiden Abschnitte S489-S495 sowie S501-T506 eine synergistische Funktion für das Ausmaß der Arrestininteraktion einnehmen, wurde die FRET-Änderung von Arrestin-3 am PTHR PD3 untersucht. Mit dieser Mutante konnten FRET-Änderungen von $4,9 \pm 0,7$ % (SEM) erzielt werden, was einer 80-prozentigen Reduktion des Signals verglichen zum Wildtyp-PTHR entspricht (**Abbildung 3.33**). Dementsprechend kann die Funktion der Phosphorylierungsstellen innerhalb von S489-S495 und S501-T506 als synergistisch für die Interaktion mit Arrestin-3 eingestuft werden, jedoch sind diese beiden Abschnitte nicht additiv im Hinblick auf die totale Rezeptorphosphorylierung (vgl. **Abbildung 3.32** mit **Abbildung 3.33** A, B). Um zu überprüfen, ob die weiter distal liegenden Phosphorylierungsstellen im PTHR die mit PD3 gemessene residuale Interaktion mit Arrestin-3 hervorrufen, wurde die Mutante PD5, in welcher 18 von 26 potentiellen Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert wurden, getestet. Wie in **Abbildung 3.33** gezeigt, wurde mit PTHR PD5 ein vergleichbares FRET-Signal wie mit PTHR PD3 erhalten. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die distalen Phosphorylierungsstellen im PTHR-C-Terminus keine zusätzliche Funktion für die Interaktion mit Arrestin-3 innehaben. Sehr überraschend war der Befund, dass die PTHR PD3 Mutante mit einer zusätzlichen S519A Mutation (PD3, S519A **Abbildung 3.31**) die Amplitude der Reaktion mit Arrestin-3 verglichen mit der Amplitude von Arrestin-3 am PTHR PD5 oder PD3 fast verdreifachte. Möglicherweise begünstigt die Mutation von S519A in Abwesenheit der für die Arrestinbindung relevanten Phosphorylierungsstellen die Interaktion mit strukturellen Elementen des Rezeptors. Um den Befund, dass die Phosphorylierung zwischen S501 und T506 von Bedeutung für die Arrestininteraktion ist, etwas genauer zu untersuchen, wurde ein PTHR generiert, in welchem ausschließlich T503 und S504 zu Alanin mutiert waren. Mit diesem Rezeptor lag die Amplitude des FRET-Signalanstiegs mit Arrestin-3 bei etwa $7,0 \pm 1,1$ % (SEM) (**Abbildung 3.33** A, B) was einer Signalreduktion von etwa 72 % entsprach, verglichen zur Interaktion zwischen Arrestin-3 und dem Wildtyp-PTHR. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die Phosphorylierung von T503 und S504

eine entscheidende funktionelle Bedeutung für die Arrestin-3-Interaktion mit dem PTHR hat. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass insbesondere die Phosphorylierung zwischen S501 und T506 Voraussetzung für die robuste Arrestininteraktion mit dem aktivierten PTHR ist. In diesen Versuchen werden die Amplituden der FRET-Änderung als Maßgröße für die Interaktion zwischen Arrestin-3 und dem PTHR herangezogen. Um die Vergleichbarkeit der FRET-Signalamplituden zu gewährleisten, ist es wichtig, die Faktoren, welche die Amplitude des Signals beeinflussen, zu kontrollieren. Neben Parametern wie Abstand und Orientierung der Fluorophore zueinander (siehe Kapitel 2.2.4.1.3) spielt das relative Expressionsverhältnis zwischen Akzeptor- und Donorfluorophor eine sehr wichtige Rolle. Damit für jedes Donormolekül ein Akzeptormolekül für den potentiellen Energietransfer zur Verfügung stehen kann, ist es von Vorteil, wenn das mit YFP markierte Protein, der FRET-Akzeptor, im Überschuss vorliegt. Liegt der Fall vor, dass ein Überschuss an Donormolekülen vorhanden ist, so kann die Amplitude bei der ratiometrischen Darstellung $\Delta F_{\text{YFP}} / F_{\text{CFP}}$ künstlich verkleinert werden, ohne einen relevanten biologischen Sachverhalt zu repräsentieren. Aus diesem Grund wurde das relative Expressionsverhältnis zwischen YFP-markierten PTH-Rezeptoren und CFP-markiertem Arrestin-3 in jeder Einzelmessung analog zu 3.1.9 überprüft. Die Beurteilung der Werte erfolgte mit Hilfe eines Referenzkonstruktes, in welchem ein Fusionsprotein YFP und CFP gleichermaßen stark exprimierte (s. Kapitel 2.2.4.1.3). **Abbildung 3.33 C** zeigt, dass in allen Fällen die mit YFP markierten PTH-Rezeptoren im Überschuss vorlagen. Somit war die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der FRET-Amplituden in allen Messungen erfüllt.

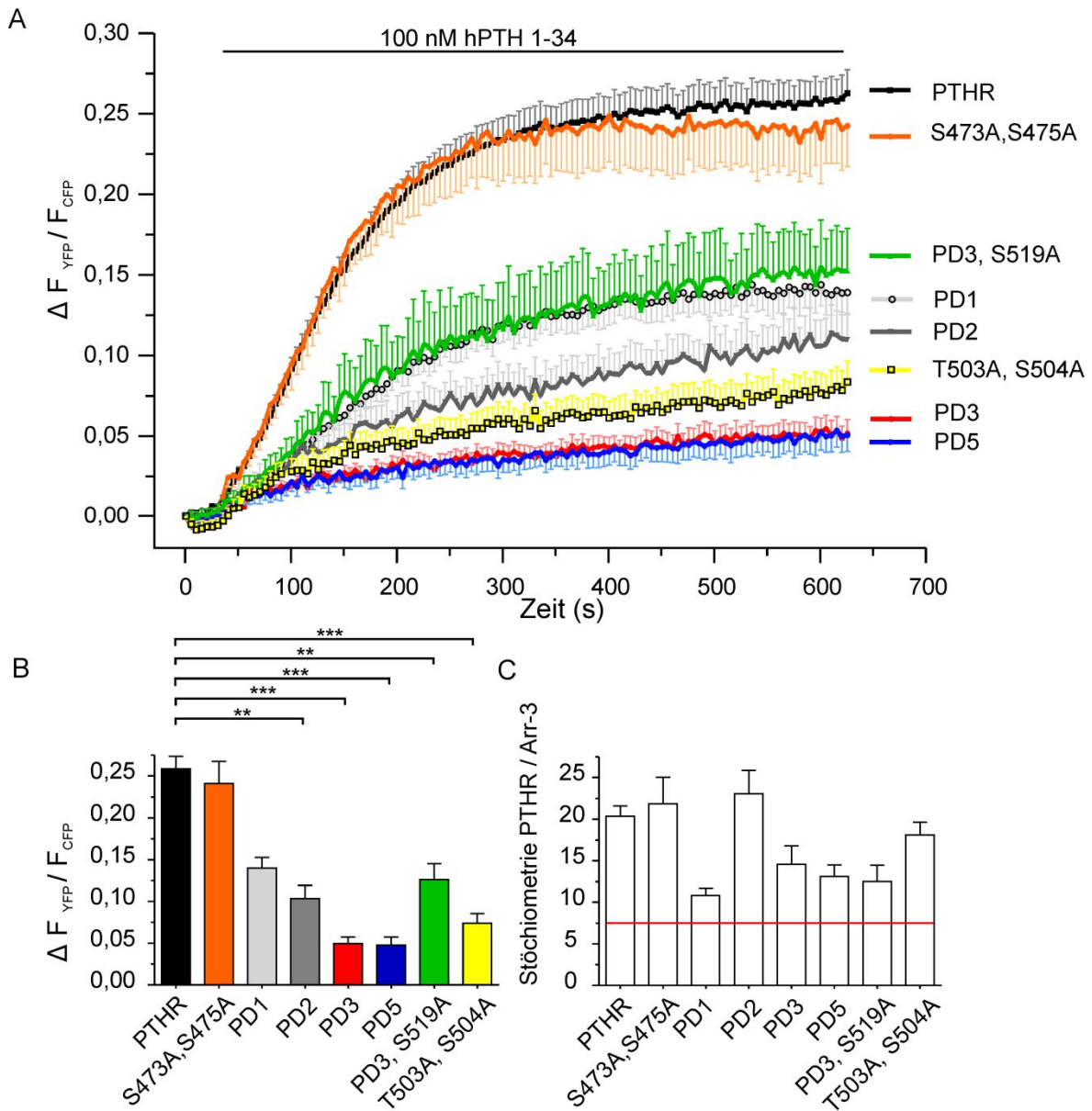


Abbildung 3.33: Funktionelle Relevanz des PTHR-C-Terminus für die Interaktion mit Arrestin-3 HEK293T-Zellen wurden transient mit verschiedenen PTH-Rezeptoren, die C-terminal mit YFP markiert waren (PTHR; PTHR S473A, S475A; PTHR PD1; PTHR PD2; PTHR PD5; PTHR PD3, S519A; PTHR T503A, S504A) und Arrestin-3-CFP transfiziert. Agonistabhängige FRET-Änderungen wurden mit 100 nM hPTH 1-34 in 0,1 % BSA/Tyrode nach 30 s Vorinkubation in 0,1 % BSA/FRET Puffer im Abstand von 5 s aufgenommen (Konfokalmikroskop; Visitech-Setup). (A) Gemittelte Darstellung der absoluten FRET-Änderungen aus Einzelmessungen. Zur besseren Visualisierung sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler nur in eine Richtung aufgetragen. (PTHR n=80, PTHR S473A, S475A n=11, PTHR PD1 n=10, PTHR PD2 n=10, PTHR PD3 n=18, PTHR PD5 n=12, PTHR PD3 S519A n=10, PTHR T503A, S504A n=12). (B) Statistische Auswertung durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung in jeder Einzelmessung, ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns multiplem Vergleichstest. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (C) Darstellung der relativen Expressionslevel von YFP-markierten PTH-Rezeptoren und Arrestin-3-CFP. In allen Bedingungen lag ein Überschuss an Akzeptorfluorophoren (PTHR-YFP) vor. Die rote Linie markiert das YFP/CFP-Verhältnis des Referenzkonstrukts, in dem CFP und YFP im Verhältnis 1:1 vorlagen. Diese Daten wurden mit Hilfe von Sandra Engel gemessen.

3.2.4 Proximale Serine und Threonine im PTHR determinieren die Arrestin-3-Rekrutierung

Bestimmt das Ausmaß der Rezeptorphosphorylierung die initiale Arrestin-3-Rekrutierung nach Stimulation des PTHR? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die zeitabhängige Arrestin-3-Rekrutierung an den PTHR und an verschiedene PTHR-Mutanten parallel zu den in 3.2.3 durchgeführten FRET-Messungen ermittelt. Am stärksten ausgeprägt war die Arrestin-3-Translokation am PTHR, welcher alle potentiellen Phosphorylierungsstellen besaß. Eine starke Beeinträchtigung der Translokation war insbesondere mit den PTHR-Mutanten zu beobachten, in welchen die Phosphorylierung zwischen S501 und T506 nicht möglich war (PTHR PD2; PD3; PD5; T503A, S504A **Abbildung 3.31**, **Abbildung 3.34**). Dies deutet darauf hin, dass dieser Bereich eine wichtige Rolle für die Arrestinaktivierung nach Rezeptorstimulation spielt. Eine besondere Funktion hierbei scheinen T503 und S504 zu erfüllen, da allein die Mutation dieser beiden Aminosäuren zu Alaninen die Membrantranslokation von Arrestin-3 an den aktivierten PTHR massiv beeinträchtigte. Es wurde eine starke Korrelation zwischen dem Ausmaß der Arrestin-3-PTH-Rezeptorinteraktion und dem Ausmaß der Arrestin-3-Translokation gefunden. Daher scheint die Arrestintranslokation ein notwendiges Kriterium und zugleich der limitierende Faktor für die Interaktion am PTHR zu sein.

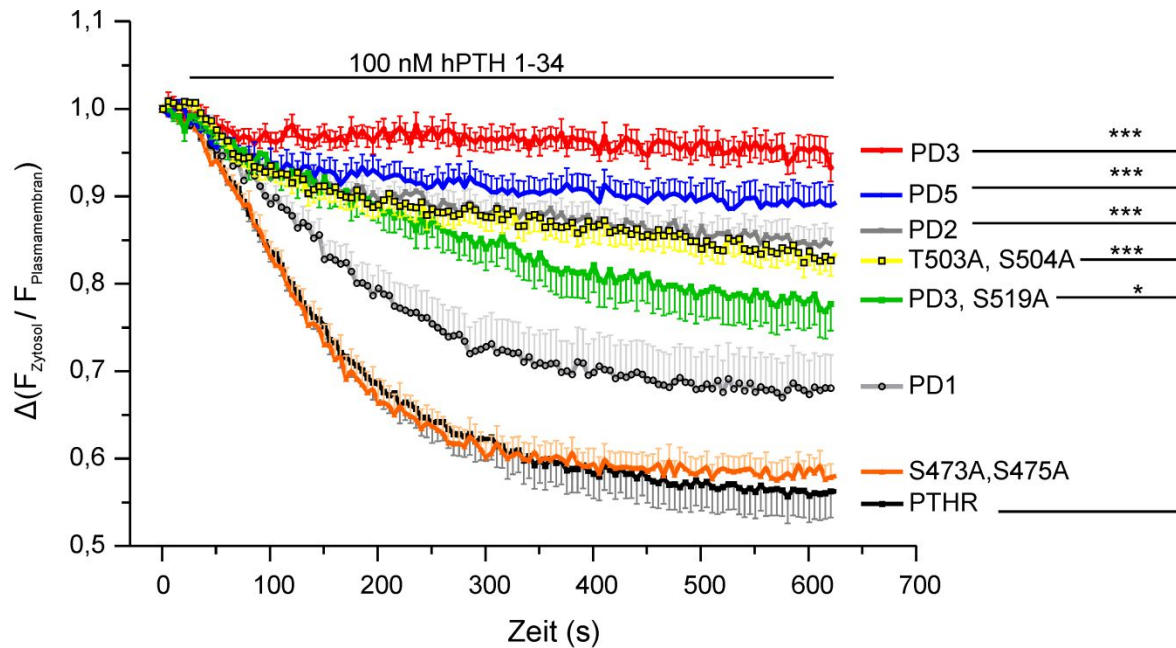


Abbildung 3.34: Ausmaß der Arrestin-3 Membrantranslokation mit verschiedenen PTHR-Mutanten HEK293T-Zellen wurden wie in Abbildung 3.33 beschrieben, transfiziert und gemessen. Vor und nach jeder FRET-Messung wurde eine konfokale Aufnahme von Arrestin-3-CFP bei 405 nm und PTHR-YFP bei 515 nm erstellt. Das Ausmaß der Arrestin-3-Translokation wurde durch Bildung der zeitabhängigen Änderung des Quotienten der CFP-Fluoreszenz ($F_{\text{Zytoplasma}} / F_{\text{Plasmamembran}}$) bestimmt. Die Darstellung zeigt gemittelte Einzelwerte ($\text{MW} \pm \text{S.E.M.}$). Da die FRET-Änderungen und das Ausmaß der Translokation jeweils an der gleichen Zelle bestimmt wurden, entspricht die Anzahl der Translokationsmessungen der Anzahl der FRET-Messungen (s. Abbildung 3.33). Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Fluoreszenzänderung ($F_{\text{Zytoplasma}} / F_{\text{Plasmamembran}}$) in jeder Einzelmessung, ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns multiplem Vergleichstest. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Diese Daten wurden mit Hilfe von Sandra Engel gemessen.

3.2.5 Die Phosphorylierungen zwischen S501 und T506 erhöhen die Affinität von Arrestin-3 zum PTHR

Welche Phosphorylierungsstellen im PTHR bestimmen über die Affinität von Arrestin-3? Wie in 3.2.4 beschrieben, wird das Ausmaß der Arrestin-3 Interaktion mit dem PTHR insbesondere von den Phosphorylierungsstellen zwischen S501 und T506 determiniert. Da hPTH 1-34 ein nicht auswaschbarer Ligand ist, kann man die Frage, ob das Ausmaß der Arrestin-Rezeptorinteraktion und die Affinität von Arrestin zum aktivierten Rezeptor korrelieren, nicht mit Hilfe von FRET-Experimenten beantworten. Allerdings lässt die Bestimmung der Proteinmobilität durch Zwei-Farben-FRAP Rückschlüsse über die Affinität zweier Proteine zueinander zu (2.2.4.2). Der unmodifizierte, durch hPTH 1-34 aktivierte und phosphorylierte PTHR schränkte die Mobilität von Arrestin-3 nahezu vollständig ein (**Abbildung 3.35 A, C**; **Abbildung 3.36 A, C**), obwohl in allen Experimenten der Anteil der mobilen Arrestin-3 Fraktionen mit dem PTHR bei etwa 20 % lag. Bedenkt man jedoch, dass die Mobilität der Rezeptoren nach Quervernetzung mit

Antikörpern ebenfalls bei 20 % lag, so resultieren 20 % der mobilen Arrestin-3-Fractionen allein aus der Lateraldiffusion nicht immobilisierter Arrestin-3-Rezeptorkomplexe. Wurden die Serine S489-S495 (PD1) zu Alanin mutiert, so führte dies zu einem Rückgang der FRET-Amplitude um etwa 44 %. Jedoch war der Einfluss dieser Serine auf die Mobilität von Arrestin-3 eher gering, da das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Arrestin-3-Wiederkehr am PTHR und am PTHR PD1 ähnlich verliefen (**Abbildung 3.35 A, Tabelle 3.4**). Im Gegensatz dazu spielen Phosphoserine und Phosphothreonine zwischen S501 und T506 eine bedeutende Rolle sowohl für das Ausmaß der Rekrutierung (**Abbildung 3.34**) als auch für die Affinität von Arrestin-3, da die Geschwindigkeit ebenso wie das Ausmaß der mobilen Fraktion am PTHR PD2 verglichen mit dem PTHR verdoppelt waren (**Tabelle 3.4, Abbildung 3.35 C**). Die Kombinationsmutante PTHR PD3, in welcher neun Serine und Threonine zwischen S489 und S495 zu Alanin mutiert waren, wies keine Steigerung oder Beschleunigung der Arrestin-3 Mobilität verglichen zum PTHR PD2 auf (**Abbildung 3.36 A, Tabelle 3.4**). Dies bestätigt die Vermutung, dass S489-S495 eine weniger ausschlaggebende Rolle für die Arrestin-3 Affinität am PTHR spielen. Die Daten aus MS/MS-Experimenten zeigten, dass T503 und S504 ligandenabhängig phosphoryliert werden können (**Abbildung 3.26**). Um herauszuarbeiten, ob diese beiden Stellen die Arrestin-3 Affinität beeinflussen, wurde die Rezeptormutante T503A, S504A eingesetzt. Überraschenderweise war allein durch diese beiden Punktmutationen im PTHR das Ausmaß der Arrestin-3-Interaktion drastisch reduziert (**Abbildung 3.33**). FRAP-Experimente zeigten, dass die Menge an Arrestin-3, welche noch mit der PTHR T503A, S504A Mutante interagiert, eine sehr geringe Affinität zu diesem Rezeptor aufwies. Die mobile Arrestin-3 Fraktion lag hier bei fast 50 % und die Geschwindigkeit der Wiederkehr war ähnlich hoch wie die am PTHR PD2 oder am PTHR PD3 (**Abbildung 3.36 C, Tabelle 3.4**). Um zu gewährleisten, dass die beobachteten Unterschiede der Arrestin-3-Austauschrate nicht durch unzureichend immobilisierte Rezeptoren zustande kamen, wurde sichergestellt, dass die Rezeptor-Mobilität in allen Experimenten nicht höher als 30% und im Mittel bei 20 % lag (**Abbildung 3.35 B, D; Abbildung 3.36 B, D**). Aus diesen FRAP-Experimenten kann man daher schlussfolgern, dass dieselben Phosphoserin/Threonincluster, welche das Ausmaß der Arrestin-3 Interaktion mit dem C-Terminus des PTHR bestimmen, auch die Affinität zu Arrestin-3 beeinflussen. **Abbildung 3.37** zeigt die Wiederkehr des HA-PTHR-YFP nach Photobleichen ohne vorherige Immobilisation durch Antikörper. Die Mobilität des PTHR im nicht quervernetztem Zustand war ähnlich wie die des β 2AR (s. Abschnitt 3.1.11).

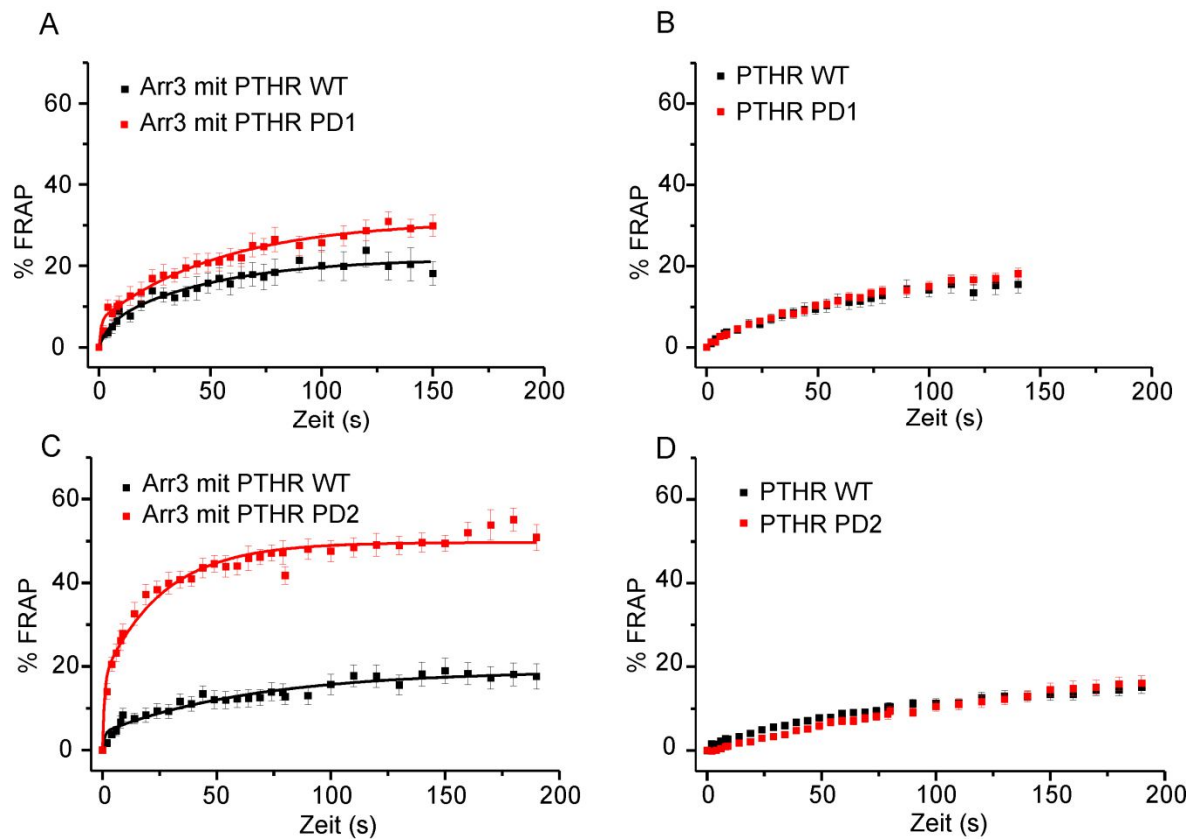


Abbildung 3.35: Bestimmung des Einflusses der Mutation S501A-T506A im PTHR auf die Affinität von Arrestin-3 mittels FRAP HEK293T-Zellen wurden transient mit dem HA-PTHR-YFP oder HA-PTHR-YFP PD1 (A, B) bzw. mit HA-PTHR-YFP PD2 (C, D) und Arrestin-3-CFP transfiziert. Vor der Stimulation mit 100 nM PTH 1-34 erfolgte die 30 minütige Inkubation mit einem anti HA-Antikörper gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit einem anti-Maus Antikörper zur Quervernetzung der Rezeptoren. Die Rezeptoren wurden dann mit 100 nM PTH 1-34 in 0,1 % BSA/FRET stimuliert und die Wiederkehr von Arrestin-3-CFP (A, C) und YFP-markierten Rezeptoren (B, D) nach Photobleichen in der Äquatorialebene der Plasmamembran wurde simultan erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der mobilen Fraktionen \pm SEM %. Arrestin-3, PTHR n=15 (A, B) bzw n=21 (C, D) Arrestin-3 PTHR PD1, n=24 (A, B); Arrestin-3 PTHR PD2 n=20 (C, D)

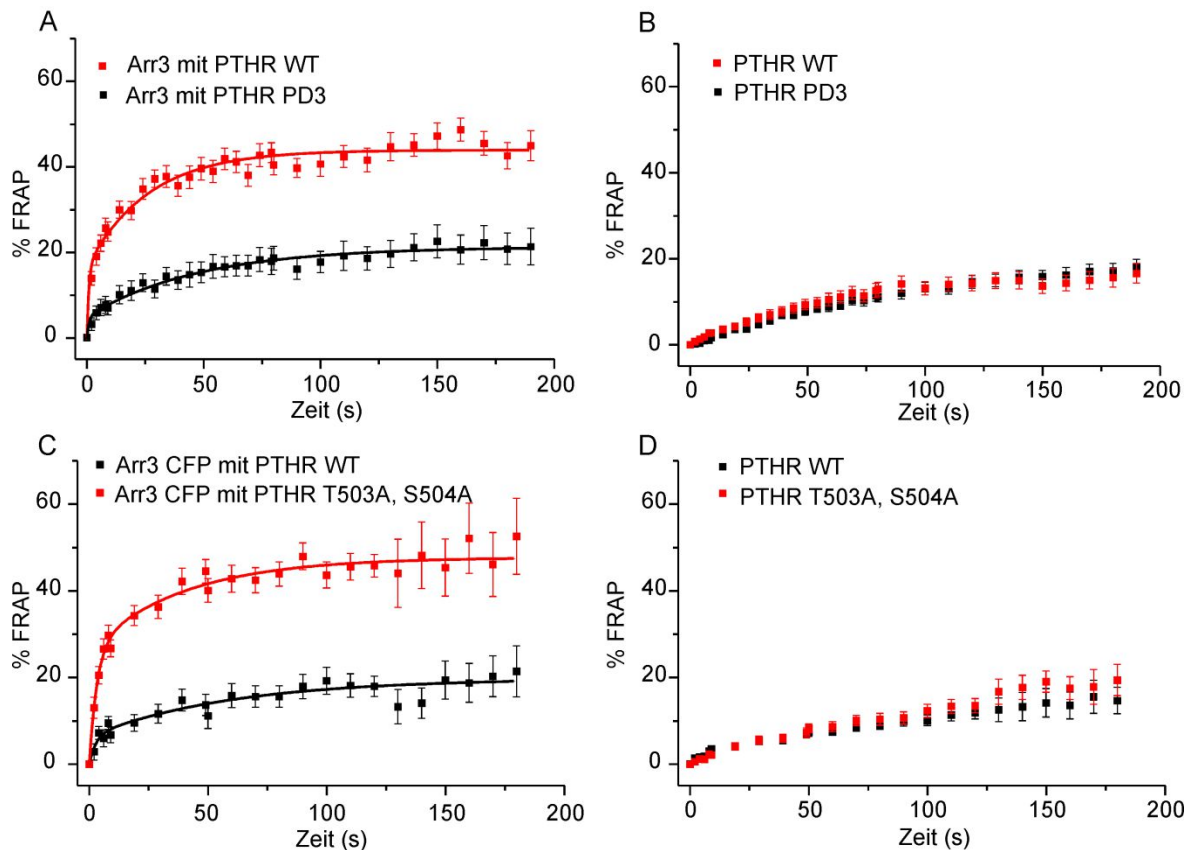


Abbildung 3.36: Bestimmung des Einflusses der Mutation T503A und S504A im PTHR auf die Affinität zu Arrestin-3 mittels FRAP HEK293T-Zellen wurden transient mit dem HA-PTHR-YFP oder HA-PTHR-YFP PD3 (A, B) bzw. mit HA-PTHR-YFP T503A und S504A (C, D) und Arrestin-3-CFP transfiziert. Die Antikörperbehandlung, Stimulation und Messung der Zellen erfolgte analog zu der in Abbildung 3.35 beschriebenen Prozedur. Dargestellt sind die Mittelwerte der mobilen Fraktionen \pm SEM %. (A, B) Arrestin-3, PTHR n=21 bzw. n=15 (C, D); Arrestin-3 PTHR PD3 n=21 (A, B); Arrestin-3, PTHR T503A, S504A n=17 (C,D)

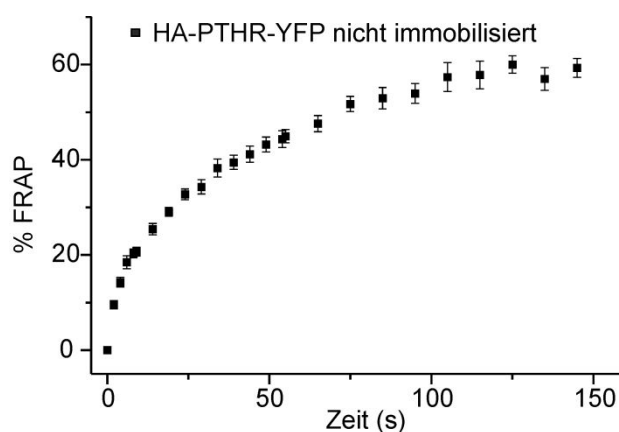


Abbildung 3.37: Fluoreszenz-Wiederkehr des HA-PTHR-YFP nach Photobleichen ohne vorherige Quervernetzung durch Antikörper HEK293T-Zellen wurden transient mit HA-PTHR-YFP transfiziert. Die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen wurde erfasst und ist als Mittelwert von n=9 Zellen \pm SEM dargestellt.

Tabelle 3.4: Zeitkonstanten und mobile Fraktionen aus FRAP-Experimenten am PTHR Der kinetische Parameter der langsamen Wiederkehr (k_{slow}) wurde mittels einer biexponentiellen Funktion (s. Material und Methoden) ermittelt. Die Halbwertszeit (HWZ) wurden mit $\ln 2/k$ berechnet.

FRAP	Arr-3 Wiederkehr \pm S.E.M (%)	$k_{\text{slow}} \pm$ S.E.M. (s^{-1})	langsame HWZ (s)
PTHR WT	19,07 \pm 0,7 - 23,94 \pm 0,9	0,0167 \pm 0,010- 0,014 \pm 0,002	40,7 - 49,5
PTHR PD1	30,9 \pm 2,5	0,019 \pm 0,003	36,5
PTHR PD2	51,2 \pm 0,7	0,031 \pm 0,004	22,4
PTHR PD3	44,9 \pm 0,7	0,033 \pm 0,004	21,0
PTHR T503A, S504A	47,7 \pm 2,2	0,025 \pm 0,011	27,7

3.2.6 Untersuchung der agonistabhängigen Arrestin-3 Kointernalisierung mit dem PTHR

Die in FRAP-Experimenten beobachtete sehr geringe Austauschrate von Arrestin-3 am immobilisierten PTHR (Kapitel 3.2.5) deutet auf eine kaum reversible Interaktion zwischen Arrestin-3 und dem agonistaktivierten Rezeptor hin. Wie in Kapitel 3.1.12 beschrieben führte die hochaffine Interaktion zwischen Arrestin und Rezeptoren zum zellulären Kotransport von ligandenstimulierten Arrestin-Rezeptorkomplexen. Wie erwartet und wie bereits in früheren Studien gezeigt (Villardaga *et al.*, 2002), war nach 40-minütiger Stimulation des PTHR mit 1 μM hPTH 1-34 der gemeinsame Transport von Arrestin-3 und Rezeptoren in intrazelluläre Kompartimente zu beobachten (**Abbildung 3.38 A**). Wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt, war die durch hPTH 1-34 induzierte Rekrutierung von Arrestin-3 durch Hemmung der Phosphorylierung zwischen S489 und S495 (PTHR PD1) etwas vermindert. FRAP-Experimente zeigten aber, dass die mobile Fraktion von Arrestin-3 am PTHR PD1 nur geringfügig höher war als am PTHR. Ähnliche Befunde spiegelten sich auch bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung von Arrestin-3 mit dem PTHR PD1 wieder. Nach 10-minütiger Stimulation der Rezeptoren war die Arrestin-3-Rekrutierung etwas schwächer ausgeprägt als am Wildtyp-PTHR, nach 40 min war Arrestin-3 zusammen mit dem PTHR PD1 teils noch in Membranbereichen zu finden, teilweise waren Arrestin-3-Rezeptorkomplexe aber auch in intrazellulären Vesikeln zu finden (weiße Pfeile **Abbildung 3.38 B**). Im Kontext der vorher durchgeführten FRET-

und FRAP-Experimente kann man daher ableiten, dass es sich bei der PTHR PD1 Mutante um einen Rezeptor des intermediären Phänotyps handelt. Deutlich schwächer ausgeprägt war die Arrestin-3 Rekrutierung am PTHR PD2 und PD3 (**Abbildung 3.39 A, B**). Beide Mutanten zeigten neben der Beeinträchtigung der Rezeptorinternalisierung nur sehr schwache Kolo-kalisation mit Arrestin in intrazellulären Kompartimenten. Dieser Befund bestätigte die in FRAP- Experimenten gefundene Reduktion der Arrestin-3-Affinität gegenüber PTHR PD2 bzw. PD3. Eine weitere Bestätigung vorangegangener FRET-Experimente ergab sich durch die konfokalmikroskopische Untersuchung des PTHR PD3, S519A. Dieser Rezeptor war im Gegensatz zum PTHR PD3 weniger in seiner Internalisierung beeinträchtigt. Die Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR PD3, S519A war sowohl nach 10 Minuten als auch nach 40 Minuten Stimulation mit hPTH 1-34 überwiegend membranständig (**Abbildung 3.40 A**). Der PTHR PD5 wies eine vergleichbare Beeinträchtigung in der Internalisierung auf wie PD2 und PD3, auch die Arrestin-3 Rekrutierung an die Plasmamembran war an diesem Rezeptor nur sehr schwach ausgeprägt. Interessanterweise konnte aber selbst mit dem PTHR PD5, in welchem neben den acht für die Arrestinbindung relevanten Phosphorylierungsstellen weitere acht Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert waren, noch eine schwach ausgeprägte Arrestintranslokation beobachtet werden. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse vorangegangener FRET-Messungen und deutet darauf hin, dass neben der Phosphorylierung des PTHR-C-Terminus noch andere Strukturen bei der Rekrutierung von Arrestin-3 involviert sein müssen.

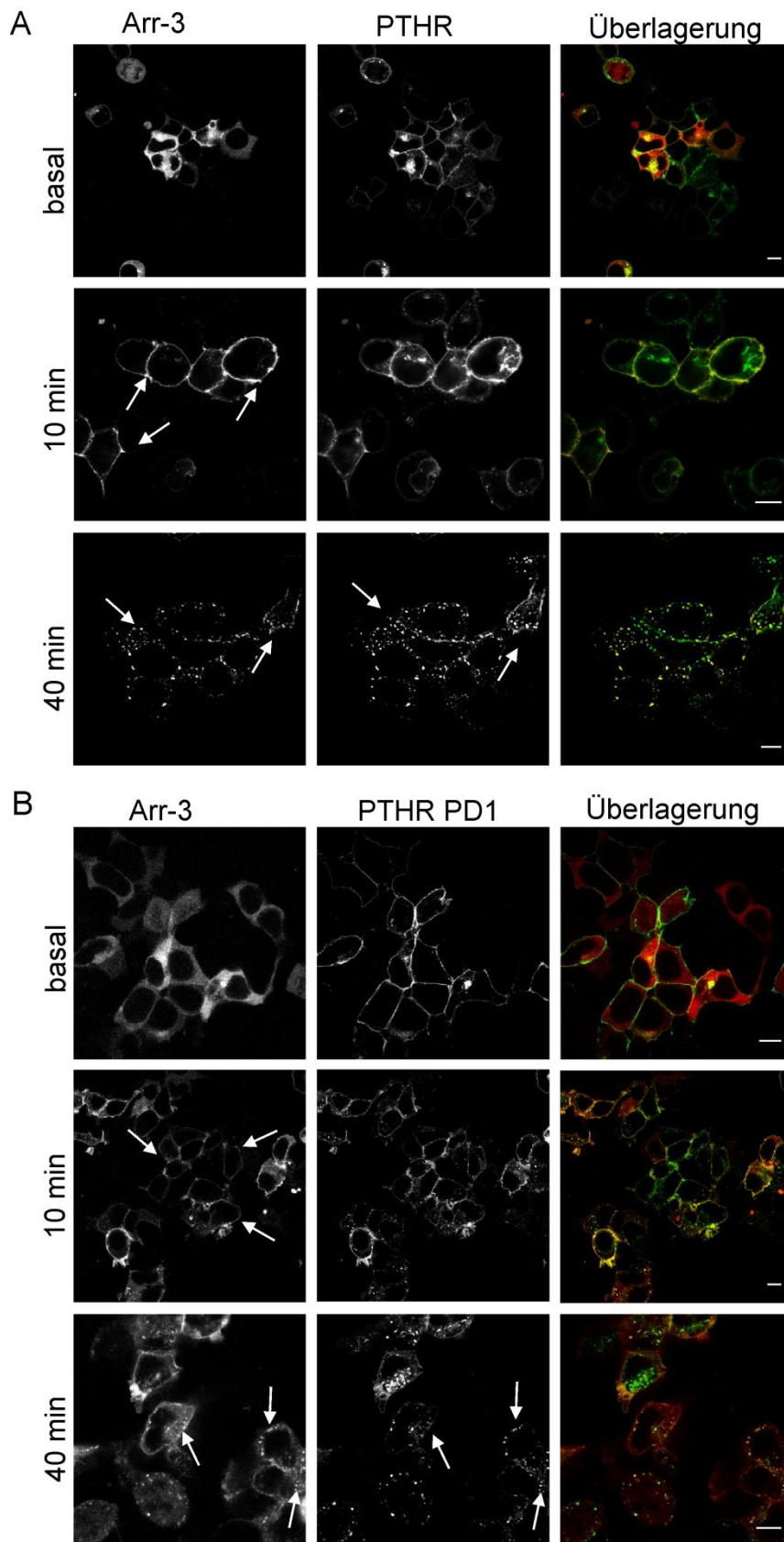


Abbildung 3.38: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR oder am PTHR PD1
 Transient mit PTHR-YFP (A) oder PTHR-YFP PD1 und Arrestin-3-CFP transfizierte HEK239T-Zellen wurden unstimuliert oder 10 bzw. 40 min mit 1 μ M hPTH 1-34 in 0,1 % BSA/Tyrosin bei 37°C stimuliert und anschließend in 4 % PFA fixiert. Die Visualisierung erfolgte konfokalmikroskopisch. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Die Pfeile dienen zur Verdeutlichung der Lokalisation von Arrestin-3 bzw. Rezeptoren.

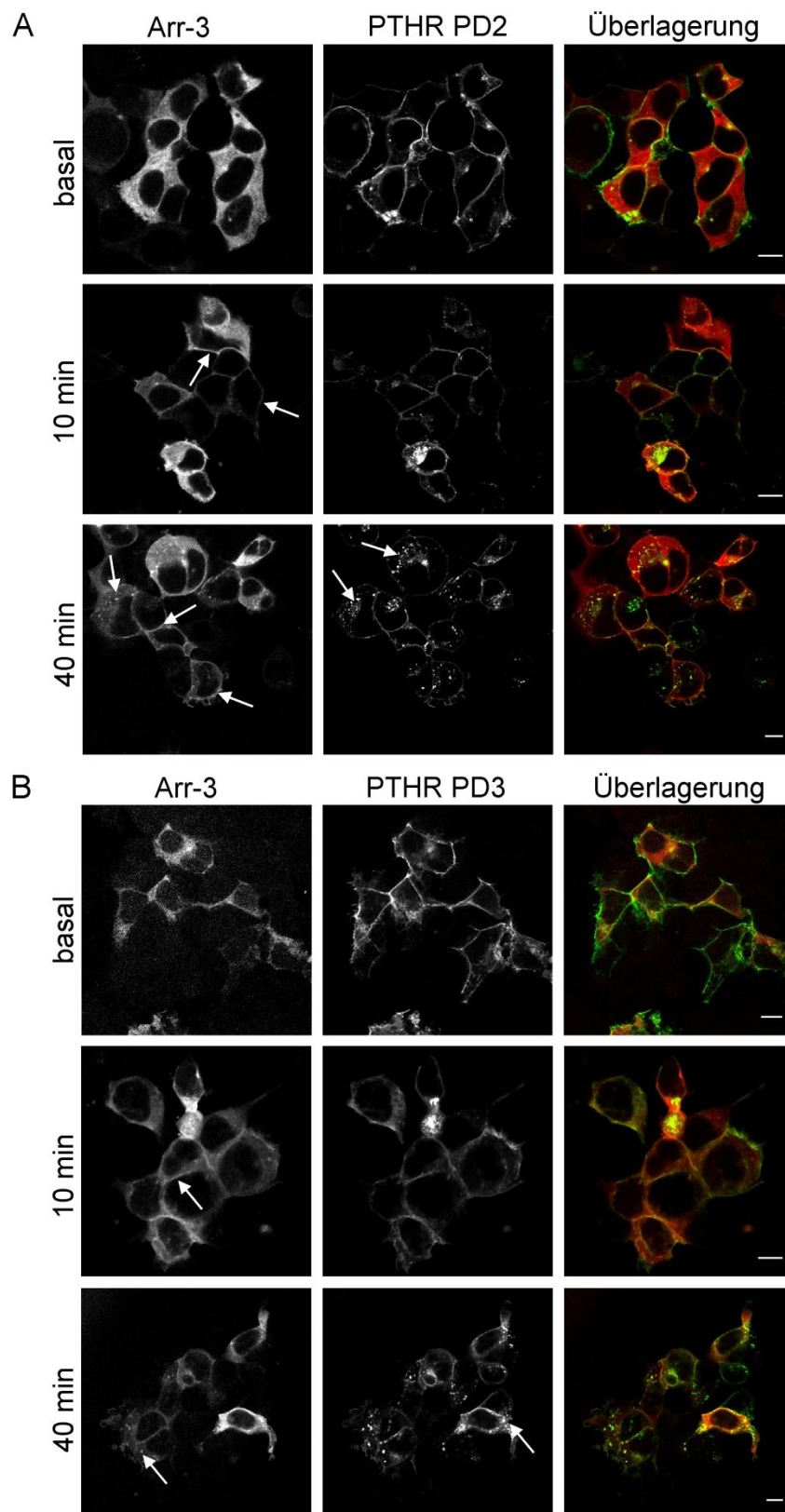


Abbildung 3.39: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR PD2 oder am PTHR PD3
 Transient mit PTHR-YFP PD2 (A) oder PTHR-YFP PD3 und Arrestin 3-CFP transfizierte HEK239T-Zellen wurden behandelt wie in **Abbildung 3.38** beschrieben.

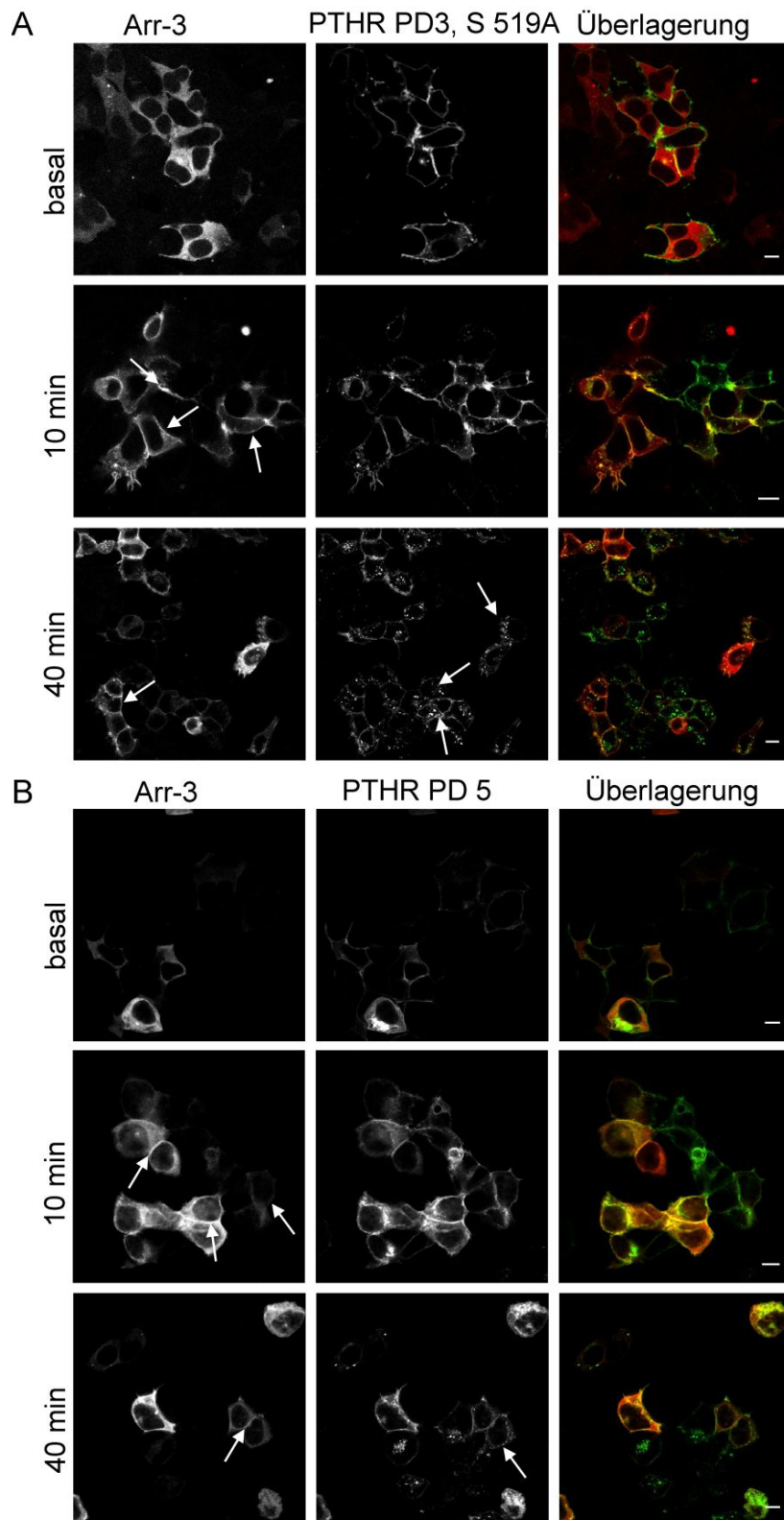


Abbildung 3.40: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR PD3, S510A oder am PTHR PD5 Transient mit PTHR-YFP PD3, S519A (A) oder PTHR-YFP PD5 und Arrestin 3-CFP transfizierte HEK239T-Zellen wurden behandelt wie in **Abbildung 3.38** beschrieben.

3.2.7 Vergleich des vollen Agonisten hPTH 1-34 mit dem Liganden D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34

Seit langem ist bekannt, dass es sich bei dem modifizierten PTH-R Liganden D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 um einen Parathyroidhormon-Rezeptorantagonisten handelt (Goldman *et al.*, 1988). Spätere Studien konnten zeigen, dass D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 sowohl am PTHR vom Subtyp 1 als auch vom Subtyp 2 antagonistische Effekte aufweist (Misiano *et al.*, 2003; Potthoff *et al.*, 2011). Interessanterweise brachten andere Arbeiten hervor, dass es sich bei D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 um einen Liganden handelt, welcher funktionelle Selektivität aufweist und arrestin-3-abhängige ERK1/2 Aktivierung vermittelt (Gesty-Palmer *et al.*, 2006). Weiterführende Untersuchungen zeigten dann, dass die funktionelle Selektivität dieses Liganden die trabekuläre Knochenbildung fördert, ohne Knochenresorption zu verursachen (Gesty-Palmer *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden ob D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 die Phosphorylierung des PTHR1 in zellulären Systemen bewirken kann. Als Kontrolle diente der klassische Agonist hPTH 1-34. Wie in **Abbildung 3.41 A** gezeigt, wurde der PTHR durch Stimulation mit hPTH 1-34 aber nicht durch Inkubation mit D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 phosphoryliert. Um zu prüfen ob D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 Arrestin-3 unabhängig von der Phosphorylierung des Rezeptors rekrutieren kann, wurden FRET-Experimente durchgeführt und konfokale Aufnahmen vor und nach PTHR-Exposition mit D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 und hPTH 1-34 als Kontrolle erstellt. Sowohl mit FRET-Experimenten als auch mit konfokalmikroskopischen Aufnahmen konnte erneut gezeigt werden, dass die Stimulation mit hPTH 1-34 eine robuste Arrestin-3 Translokation bewirkt (**Abbildung 3.42 A, B**). Durch den Liganden D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 konnte jedoch weder in FRET-Versuchen noch in Aufnahmen von lebenden Zellen die Interaktion von Arrestin-3 mit dem PTHR ausgelöst werden (**Abbildung 3.42 A, B**).

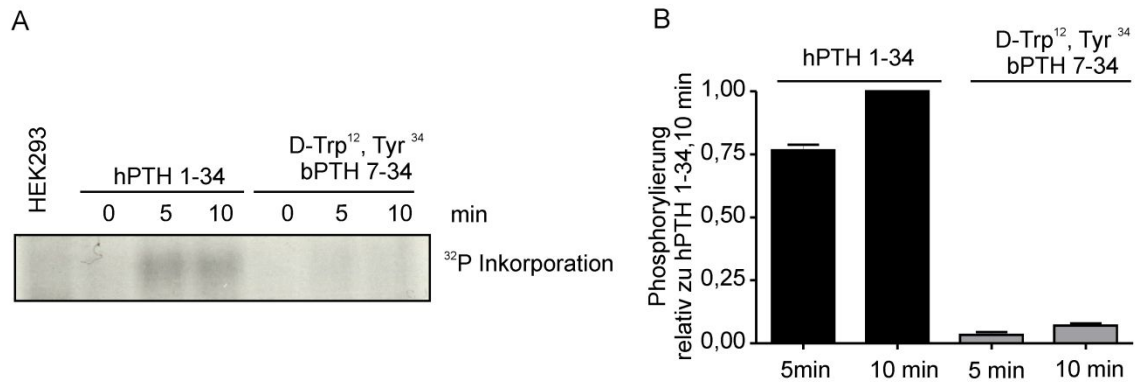


Abbildung 3.41: PTH-Rezeptorphosphorylierung nach Stimulation mit hPTH1-34 oder D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 (A) Stabil mit HA-PTH_R transfizierte HEK293-Zellen wurden mit ³²P markiert und anschließend für 5 oder 10 min mit 100 nM hPTH 1-34 oder 1 μM D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 inkubiert, lysiert, immunpräzipitiert und phosphorylierte Proteine wurden autoradiographisch visualisiert. Die Markierung sowie die Stimulation wurden in KREBS-Puffer supplementiert mit 0,1 % BSA durchgeführt. (B) Quantifizierung der Phosphorylierung wie unter A gezeigt.

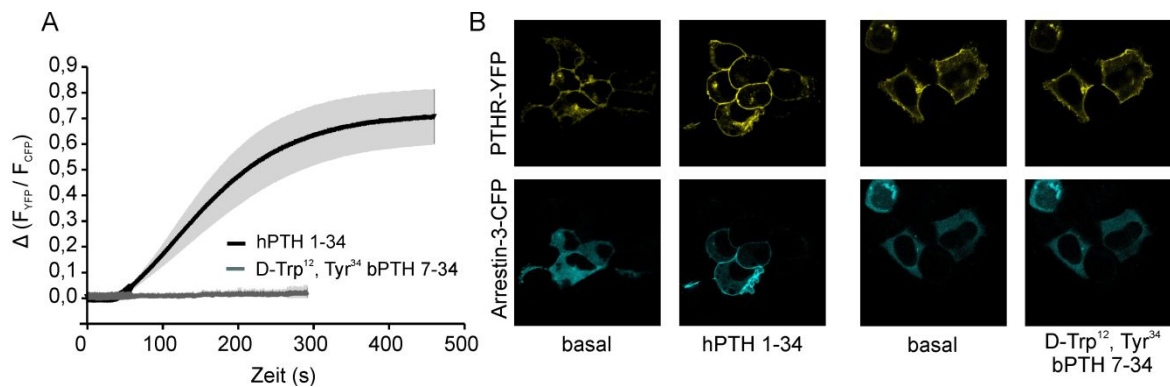


Abbildung 3.42: Arrestin-3 Interaktion mit dem PTHR nach Stimulation mit hPTH1-34 oder D Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 HEK293T-Zellen wurden transient mit Arrestin-CFP und PTHR-YFP transfiziert. (A) Die FRET-Änderungen nach Stimulation mit 100 nM hPTH 1-34 wurden gemittelt (n=4), obere Spur. Nach Inkubation mit 1 μM D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 konnte keine FRET-Änderung beobachtet werden (n=4), untere Spur. (B) Konfokalaufnahmen zeigten, dass Arrestin-3 nach 5 min Stimulation mit 100nM hPTH 1-34 an den PTHR rekrutiert wird (links). Die Exposition mit 1 μM D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 führte nicht zur sichtbaren Membrantranslokation von Arrestin-3 an den PTHR (rechts).

3.3 Das Einfügen zweier konservativer Mutationen im β -Faltblatt 1 in Arrestin-3 beeinflusst die Affinität zu verschiedenen Rezeptormutanten in unterschiedlicher Weise.

Alle vier Arrestine weisen im N-terminalen β -Faltblatt 1 ein hochkonserviertes hydrophobes Muster aus Valin, Isoleucin, und Phenylalanin sowie zwei benachbarten positiv geladenen Lysinen auf. Die Wegnahme oder die Umkehr dieser positiven Ladungen ziehen einen dramatischen Verlust der Interaktion von visuellem Arrestin mit aktiviertem phosphoryliertem Rhodopsin nach sich (Vishnivetskiy *et al.*, 2000). Einige Zeit nach diesem Befund wurde postuliert, dass die beiden Lysine K11,12 im β -Faltblatt 1 in Arrestin-3 nach Aktivierung des AT1R spezifisch ubiquitiniert werden und daher die Affinität des Arrestins zum AT1R erhöhen. Der konservative Austausch dieser beiden Lysine zu Arginin (K11,12R) führte zu einem Verlust der Affinität zum AT1R, welcher mit einer substantiellen Reduktion der Arrestinubiquitinierung erklärt wurde (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Um zu überprüfen, ob der Verlust der Arrestinaffinität im Kontext der K11,12R-Mutation tatsächlich rezeptorspezifisch verläuft, setzten wir diese Mutante in unseren Mess-Systemen mit verschiedenen Rezeptoren ein.

3.3.1 Die Dissoziationsrate von Arrestin-3 K11, 12 R von verschiedenen β 2-adrenergen Rezeptormutanten ist verglichen mit der Dissoziationsrate von Arrestin-3 beschleunigt

Die Dissoziationsraten von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12 R wurden in einzelnen Zellen in Echtzeit mittels FRET wie unter 3.1.4 beschrieben, am β 2AR, β 2AR SSS sowie am β 2V2R als Modellrezeptoren untersucht. Da die Dissoziationszeit von Arrestin-3 vom isoprenalinstimulierten β 2-adrenergen Rezeptor mit einer Halbwertszeit von etwa 27-30 s (Tabelle 3.1, Tabelle 3.5) als schnell eingestuft werden kann, wurde vermutet, dass diese Geschwindigkeit nicht weiter steigerbar ist. Es stellte sich jedoch heraus, dass Arrestin-3 K11,12R nach Auswaschen des Liganden Isoprenalin doppelt so schnell wie Arrestin-3 vom β 2AR abdissoziierte (Tabelle 3.5, Abbildung 3.43 A, B). Zugleich war die Interaktion von Arrestin-3 K11,12R mit dem β 2AR mit einem Dissoziationsanteil von 97 % vollständig reversibel, während Arrestin-3 innerhalb des beobachteten Zeitraumes eine residuale Interaktion von etwa 25-30 % aufwies (Tabelle 3.1, Tabelle 3.5). Ähnliche Befunde ergaben sich beim Vergleich zwischen Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R am β 2AR SSS. Auch hier war die Dissoziationszeit von Arrestin-3 K11,12R doppelt so schnell wie die Dissoziationszeit von Arrestin-3 (Abbildung 3.43 B, C). Die Interaktion von

Arrestin-3 am β 2AR SSS war zu 30-40 % reversibel (**Tabelle 3.1**, **Tabelle 3.5**) während die Reversibilität des mutierten Arrestin-3 am β 2AR SSS bei 67 % lag (**Abbildung 3.43**, **Tabelle 3.5**). Somit war Arrestin-3 K11, 12R in der Lage am β 2AR SSS das Verhalten von Wildtyp-Arrestin-3 am Wildtyp- β 2AR nachzuahmen. Am β 2V2R hingegen waren die kinetischen Unterschiede in der Dissoziationsrate zwischen Arrestin-3 K11,12R und Arrestin-3 weniger stark ausgeprägt (**Abbildung 3.43** E, F). Jedoch war auch hier die Interaktion von Arrestin-3 K11, 12 R zu einem höheren Anteil reversibel als jene von Arrestin-3 (**Abbildung 3.43**, **Tabelle 3.5**).

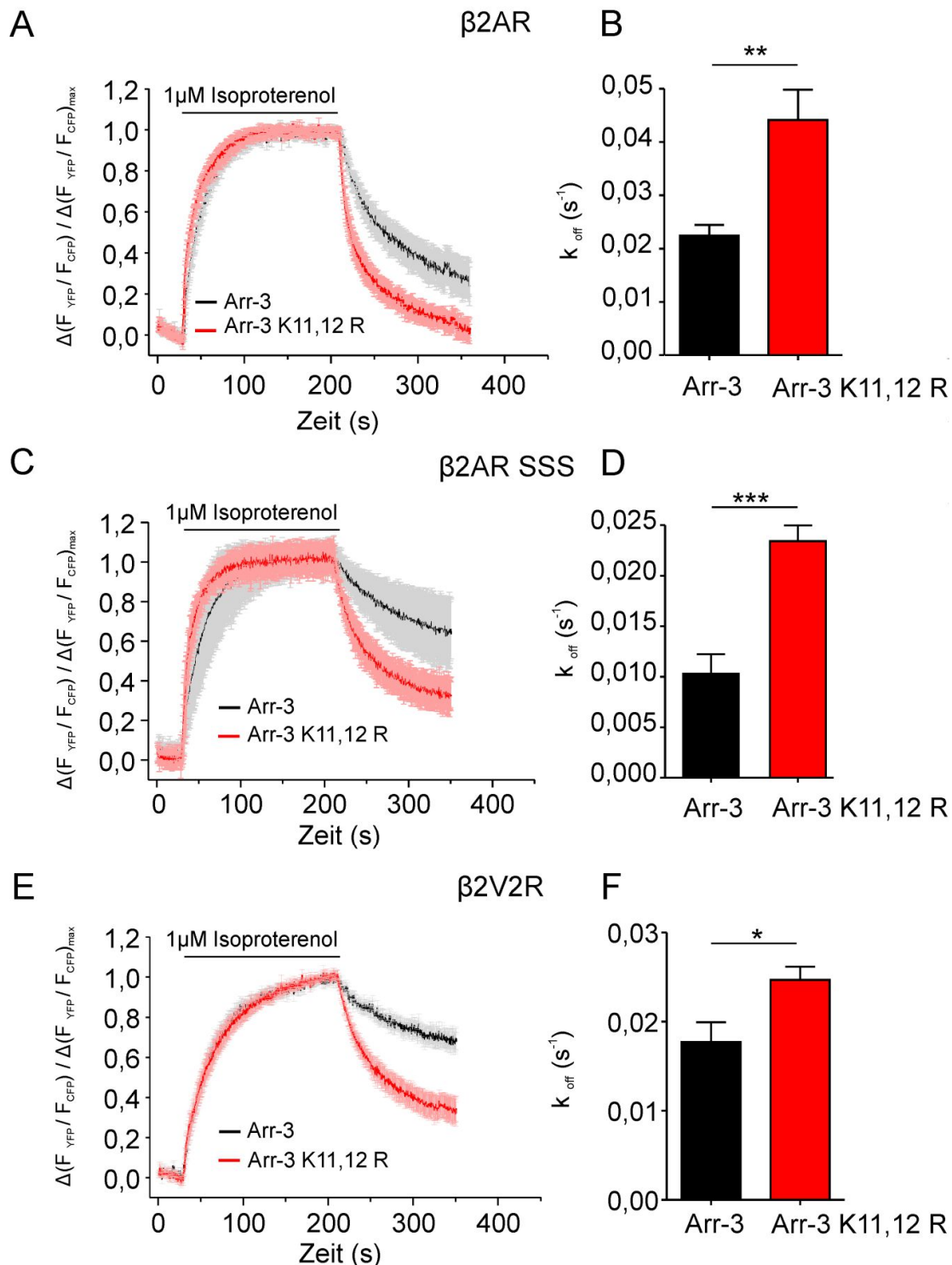


Abbildung 3.43: Vergleich der Dissoziationskinetiken zwischen Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R mit verschiedenen $\beta 2$ -adrenergen Rezeptoren mittels FRET HEK293T-Zellen wurden transient mit Arrestin-3-CFP oder Arrestin-3-CFP K11,12R, GRK2 und mit C-terminal mit YFP markierten $\beta 2$ -Rezeptoren ($\beta 2AR$, $\beta 2AR$ SSS, oder $\beta 2V2R$) transfiziert und wie unter **Abbildung 3.7** beschrieben, gemessen. (A,C,E) Einzelmessungen der Interaktion von Arrestin-3 oder Arrestin-3 K11,12R mit dem jeweils angegebenen Rezeptor wurden gemittelt und normalisiert. (B) Vergleich der Dissoziationsraten (k_{off}) von Arrestin-3 (n=9) und Arrestin-3 K11,12R (n=9) am $\beta 2AR$, t-Test nach Student, p=0,0058. (D) Die Dissoziationsraten (k_{off}) von Arrestin-3 (n=6) und Arrestin-3 K11,12R (n=8) am $\beta 2AR$ SSS wurden verglichen, t-Test nach Student, p=0,0002. (F) Die Dissoziationsraten (k_{off}) von Arrestin-3 (n=10) und Arrestin-3 K11,12R (n=15) am $\beta 2V2R$ wurden verglichen, t-Test nach Student, p=0,0127.

Tabelle 3.5: Zeitkonstanten und Ausmaß der Dissoziation von Arrestin-3 verglichen mit Arrestin-3 K11,12R an β 2-adrenergen Rezeptoren, ermittelt aus FRET-Experimenten

FRET	$k_{\text{off}} \pm \text{S.E.M. (s}^{-1}\text{)}$	$t_{0.5 \text{ off (s)}}$	(%) Anteil Arr-3 Dissoziation \pm S.E.M.
β 2AR, Arr-3	$0,022 \pm 0,002$	31,5	$74,8 \pm 9,2$
β 2AR, Arr-3 K11,12R	$0,044 \pm 0,005$	15,8	$97,2 \pm 5,2$
β 2ARSSS, Arr-3	$0,01 \pm 0,002$	69,3	$36,5 \pm 18,4$
β 2ARSSS, Arr-3 K11,12R	$0,023 \pm 0,002$	30,1	$67,1 \pm 8,9$
β 2V2AR, Arr-3	$0,018 \pm 0,002$	38,5	$32,2 \pm 4,3$
β 2V2AR, Arr-3 K11,12R	$0,025 \pm 0,001$	27,7	$65,5 \pm 6,3$

3.3.2 Vergleich der Affinität von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R zum PTHR und zum β 2V2-Rezeptor

Peptidrezeptoren wie zum Beispiel der der V2R oder der PTHR binden den nativen Liganden nahezu irreversibel. Daher wurde der Einfluss der Arrestin-3 K11,12R Mutation auf die Affinität zum PTHR in Anwesenheit des Liganden hPTH 1-34 wie unter 3.2.5 beschrieben in FRAP-Experimenten untersucht. Der immobilisierte PTHR wies ausgeprägte Unterschiede in der Einschränkung der Lateralmobilität von Arrestin-3 K11,12R verglichen mit Arrestin-3 auf. Während die Mobilität von Arrestin-3 am PTHR stark eingeschränkt war, wies Arrestin-3 K11, 12 R demgegenüber eine stark erhöhte mobile Fraktion auf, welche mit höherer Geschwindigkeit in den geblichenen Bereich diffundierte (**Abbildung 3.44, Tabelle 3.6**). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die konservative Mutation von K11, 12 zu R in Arrestin-3 zur Einschränkung der stabilen Komplexbildung mit PTH-Rezeptoren führt. Anschließend wurde ein weiterer Rezeptor (β 2V2R) der aufgrund seines C-Terminus der Klasse B Familie zugeordnet wird, untersucht. Da der N-Terminus des β 2V2-Rezeptors aus dem β 2AR besteht, konnten die

Dissoziationsraten von Arrestin-3 nach Stimulation mit dem auswaschbaren Liganden Isoprenalin bereits mit FRET bestimmt werden (**Abbildung 3.43**). Ähnlich starke Unterschiede wie beim PTHR ergaben sich für die mobile Fraktion von Arrestin-3 verglichen mit Arrestin-3 K11,12R am β 2V2R. Auch hier war die mobile Fraktion von Arrestin-3 K11,12R gegenüber Arrestin-3 etwa verdoppelt und die Geschwindigkeit der Austauschrate von Arrestin K11,12R an diesem Rezeptor war verglichen mit Arrestin-3 erhöht (**Abbildung 3.45, Tabelle 3.6**). **Abbildung 3.44 B** und **Abbildung 3.45 B** zeigen dass sowohl der PTHR als auch der β 2V2R in allen Bedingungen gleichermaßen durch Quervernetzung mit Antikörpern in ihrer Lateralmobilität eingeschränkt waren. Demzufolge konnte ausgeschlossen werden, dass die Mobilitätsunterschiede zwischen Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R durch die Lateraldiffusion von Arrestin-Rezeptorkomplexen aufgrund unterschiedlicher Immobilisation der Rezeptoren zustande kamen.

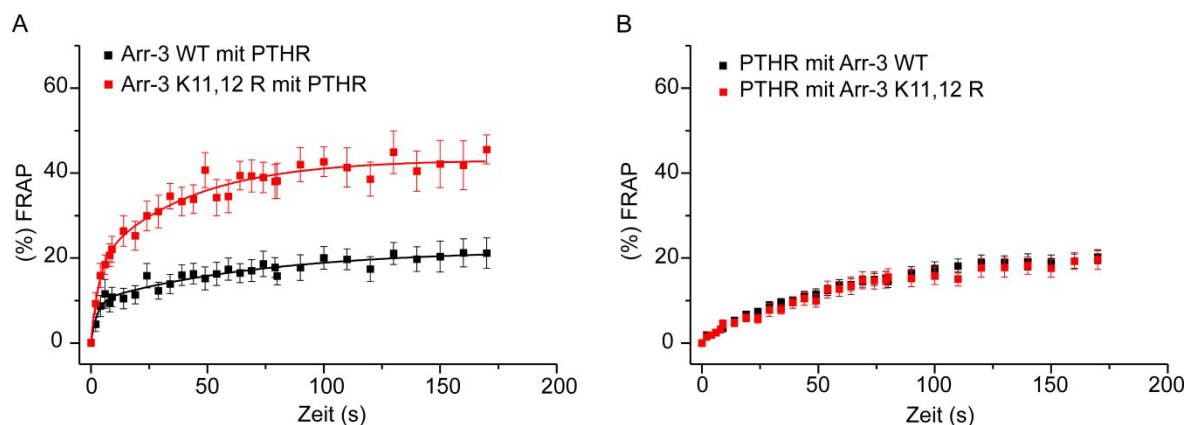


Abbildung 3.44: Bestimmung der Affinität von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R am PTHR mittels FRAP HEK293T-Zellen wurden transient mit HA-PTHR-YFP und Arrestin-3-CFP oder Arrestin-3 K11,12R-CFP transfiziert. Die Rezeptoren wurden mit anti-HA-Antikörpern aus der Maus behandelt und anschließend mit anti-Maus-Antikörpern quervernetzt (s. Material und Methoden). Die Rezeptoren wurden dann mit 100 nM hPTH 1-34 stimuliert und die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen wurde simultan für (A) CFP- und (B) YFP-markierte Proteine aufgenommen. Die Kurven repräsentieren gemittelte Werte \pm SEM Arrestin-3 (n=19), Arrestin-3 K11,12R (n=11).

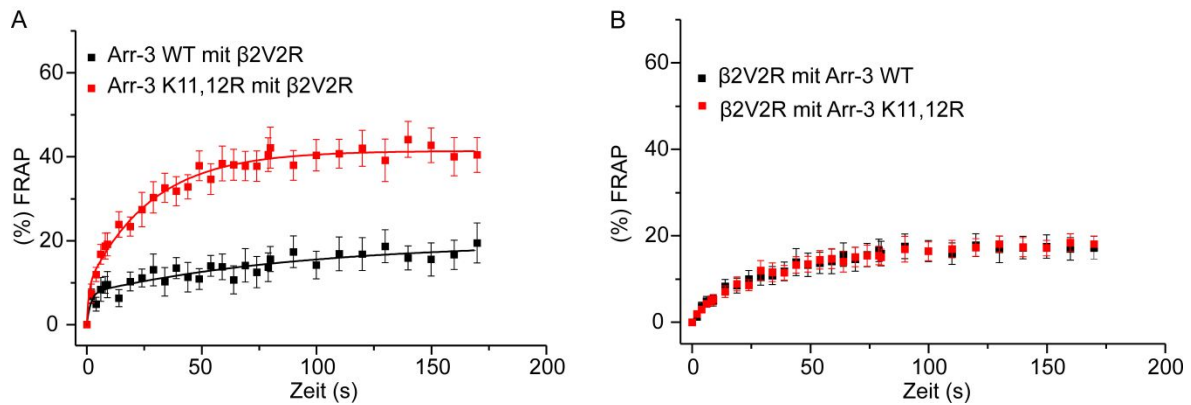


Abbildung 3.45: Bestimmung der Affinität von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R am $\beta 2V2R$ mittels FRAP HEK293T-Zellen wurden transient mit dem YFP- $\beta 2V2R$ und Arrestin-3-CFP oder Arrestin-3 K11,12R-CFP transfiziert. Die Rezeptoren wurden mit polyklonalen anti-YFP-Antikörpern quervernetzt (s. Material und Methoden). Die Rezeptoren wurden dann mit 10 μM Isoprenalin stimuliert und die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen wurde simultan für (A) CFP- und (B) YFP-markierte Proteine aufgenommen. Die Kurven repräsentieren gemittelte Werte \pm SEM Arrestin-3 ($n=15$), Arrestin-3 K11,12R ($n=18$).

Tabelle 3.6: Zeitkonstanten und mobile Fraktionen aus FRAP-Experimenten Der kinetische Parameter der langsamen Wiederkehr (k_{slow}) wurde mittels einer biexponentiellen Funktion (s. Material und Methoden) ermittelt. Die Halbwertszeit (HWZ) wurden mit $\ln 2/k$ berechnet.

FRAP konfokal	Arr-3 Wiederkehr \pm S.E.M (%)	$k_{slow} \pm$ S.E.M. (s^{-1})	langsame HWZ (s)
PTHR, Arr-3	$22,0 \pm 3,2$	$0,014 \pm 0,009$	49,5
PTHR, Arr-3 K11,12R	$43,1 \pm 2,1$	$0,025 \pm 0,009$	27,7
$\beta 2V2R$, Arr-3	$19,6 \pm 2,8$	$0,010 \pm 0,005$	69,3
$\beta 2V2R$, Arr-3 K11,12R	$41,4 \pm 0,5$	$0,035 \pm 0,003$	19,8

3.3.2.1 Zellulärer Transport von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R mit verschiedenen Rezeptormutanten

Hat der in FRET- und FRAP-Experimenten gezeigte Affinitätsverlust von Arrestin-3 K11,12R Einfluss auf den Kotransport von Arrestin-3-Rezeptorkomplexen? Um dieser Frage nachzugehen, wurde der β 2AR SSS zusammen mit Arrestin-3 oder Arrestin-3 K11,12R für 30 min mit Isoproterenol stimuliert und die Lokalisation von Arrestin und Rezeptoren konfokalmikroskopisch untersucht. Wie schon vorher gezeigt (**Abbildung 3.16**, Zindel *et al.*, 2014) ist die Affinität von Arrestin-3 am β 2AR SSS derart erhöht, dass Arrestin-3 zusammen mit dem β 2AR SSS endozytiert wird (**Abbildung 3.46 A**). Der zelluläre Kotransport von Arrestin-3 K11,12R und dem β 2AR SSS hingegen war deutlich weniger ausgeprägt, jedoch nicht völlig verschwunden (**Abbildung 3.46 B, C**). Am β 2V2R zeigten sowohl Arrestin-3 als auch Arrestin-3 K11,12R Kolo­kalisation in intrazellulären Kompartimenten nach 30-minütiger Stimulation mit Isoproterenol (**Abbildung 3.47 A, B, C**). Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Mutation der beiden benachbarten Lysine K11,12 zu Arginin den Kotransport mit dem V2R nicht beeinträchtigt (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Interessanterweise ergab sich bei der Untersuchung des PTHR, dass die beiden vicinalen Lysine K11,12 bei der hPTH 1-34 induzierten endosomalen Rekrutierung von Arrestin-3 eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. **Abbildung 3.48 B** zeigt, dass Arrestin K11, 12 R nach 30-minütiger Stimulation mit hPTH 1-34 kein Arrestin-3 K11,12R in endozytierten Vesikeln aufweist. Auch der PTHR selbst schien zwar nicht gänzlich in der Internalisierung beeinträchtigt zu sein, jedoch waren hier weniger intrazelluläre Vesikel und mehr membranständige Rezeptoren nach 30-minütiger Stimulation zu beobachten. Die verbleibende Membranständigkeit des PTHR erklärt auch die residuale Kolo­kalisation zwischen Arrestin-3 K11,12R und PTH-Rezeptoren (**Abbildung 3.48 C**). Im Gegensatz dazu wies Arrestin-3 nach Stimulation des PTHR eine sehr robuste Rekrutierung in intrazelluläre Kompartimente und Kolo­kalisation mit internalisierten PTHR auf (**Abbildung 3.48 A, C**).

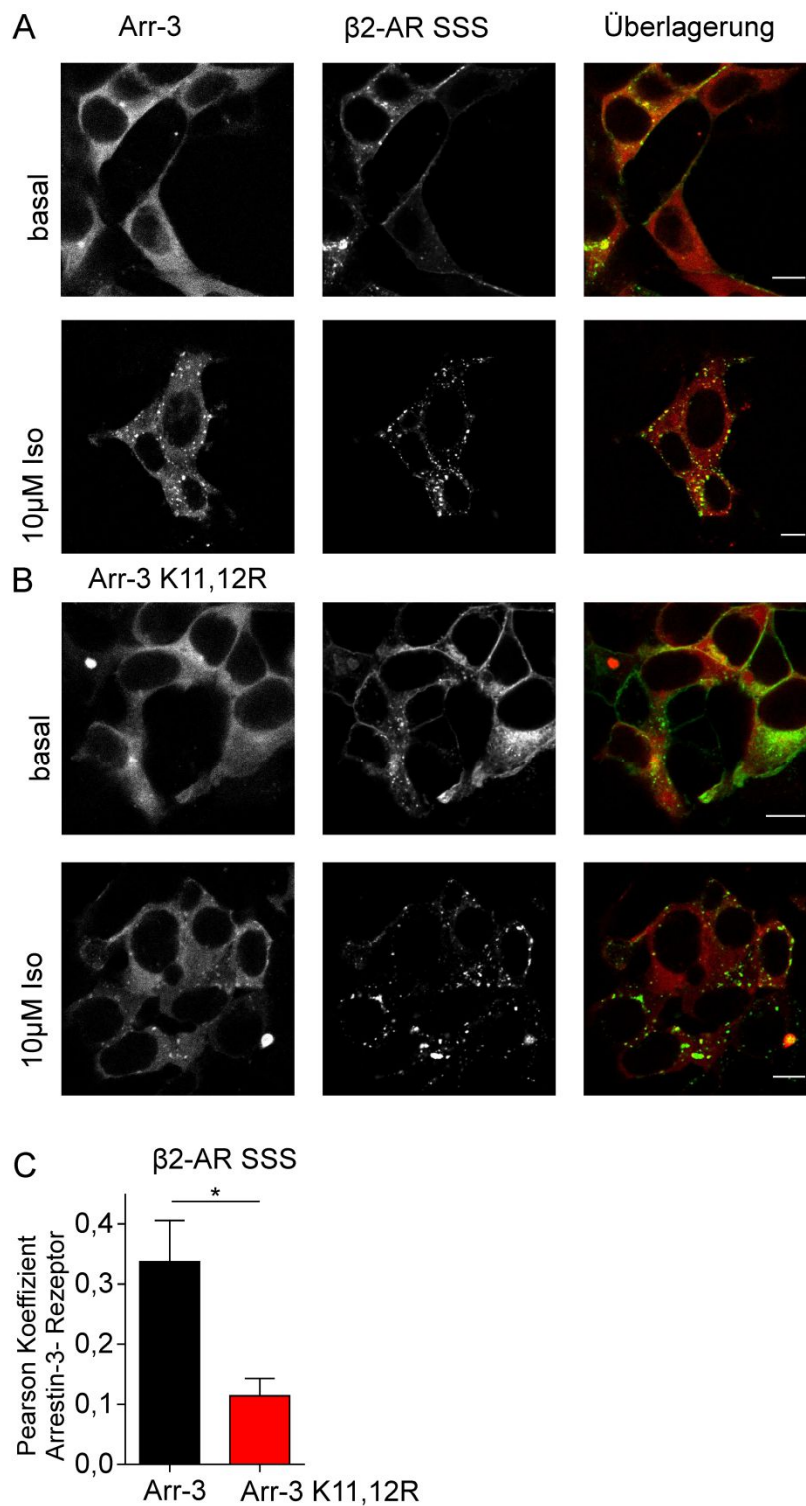


Abbildung 3.46: Intrazellulärer Transport von Arrestin-3 K11,12R am β 2AR SSS (A) Transient mit β 2AR SSS-YFP und Arrestin-3-CFP oder (B) Arrestin-3-CFP K11,12R sowie GRK2-transfizierte HEK293T-Zellen wurden 30 min mit 10 μ M Isoproterenol bei 37°C stimuliert, fixiert und mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes visualisiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Unter basalen Bedingungen war der β 2AR SSS überwiegend an der Plasmamembran und Arrestin-3 cytosolisch lokalisiert. Nach der Behandlung mit Isoproterenol waren die Rezeptoren als punktierte Strukturen an der Plasmamembran oder im Cytosol zu finden. (C) Korrelationskoeffizient nach Pearson \pm SEM berechnet für die Überlappung zwischen Arrestin 3-CFP und YFP-markierten Rezeptoren (Arr-3 n=10, Arr-3K11,12R n=11 erhalten aus einer Transfektion), mit anschließend durchgeführtem t-Test nach Student mit Welch-Korrektur p=0,0109

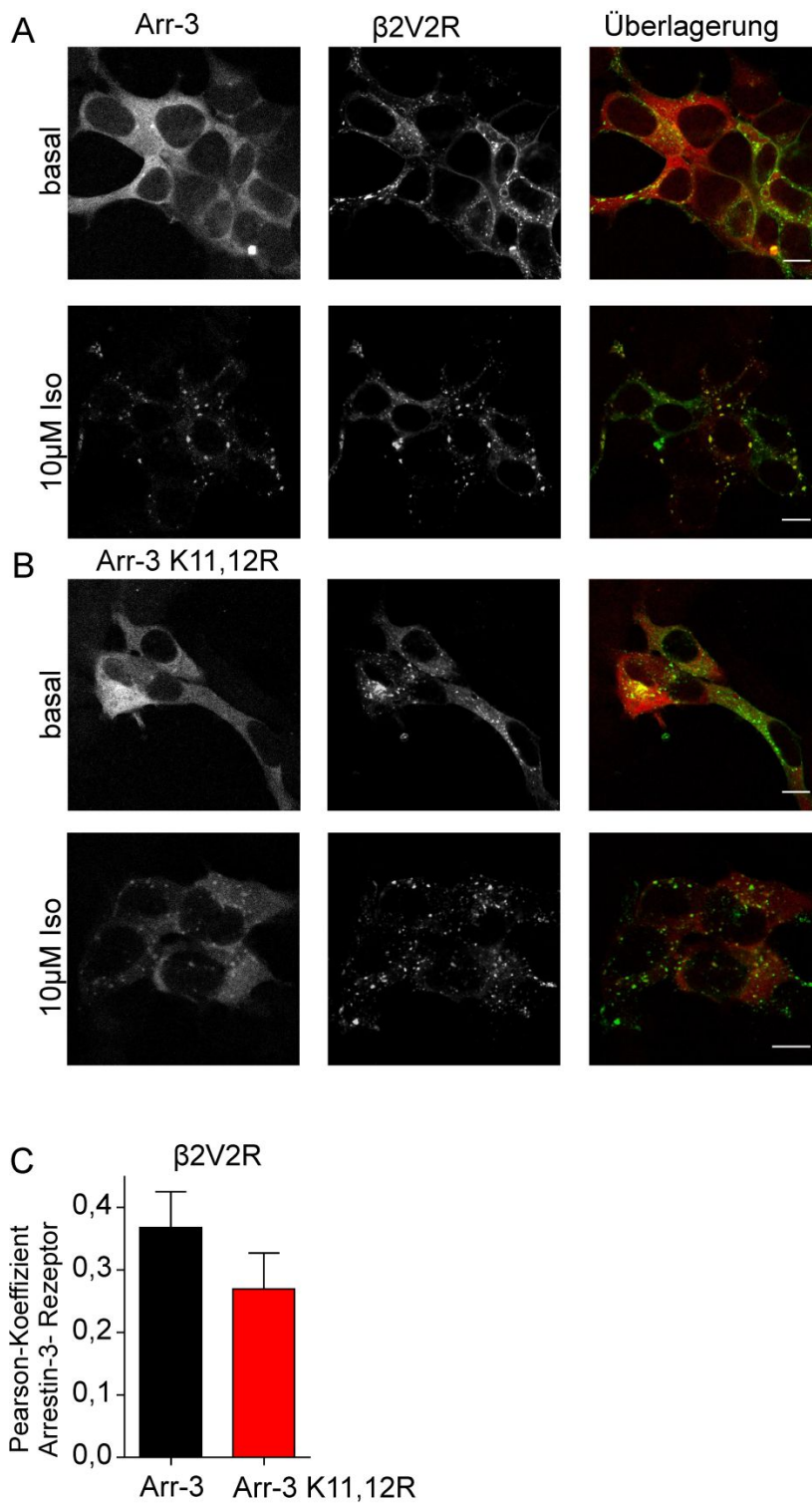


Abbildung 3.47: Einfluss der K11,12R Mutation in Arrestin-3 auf die endosomale Rekrutierung mit dem $\beta 2V2R$ Transient mit $\beta 2V2R$ -YFP und Arrestin-3-CFP oder (B) Arrestin-3-CFP K11,12R sowie GRK2-transfizierte HEK293T-Zellen wurden 30 min bei 37°C mit 10 μM Isoproterenol stimuliert und wie in Abbildung 3.46 beschrieben untersucht. Die Skalierung entspricht 10 μm . (C) Kolokalisation nach Pearson \pm SEM, (Arrestin-3 n=12, Arrestin-3 K11,12R n=20, erhalten aus zwei unabhängigen Experimenten) ; t-Test nach Student p=0,2662.

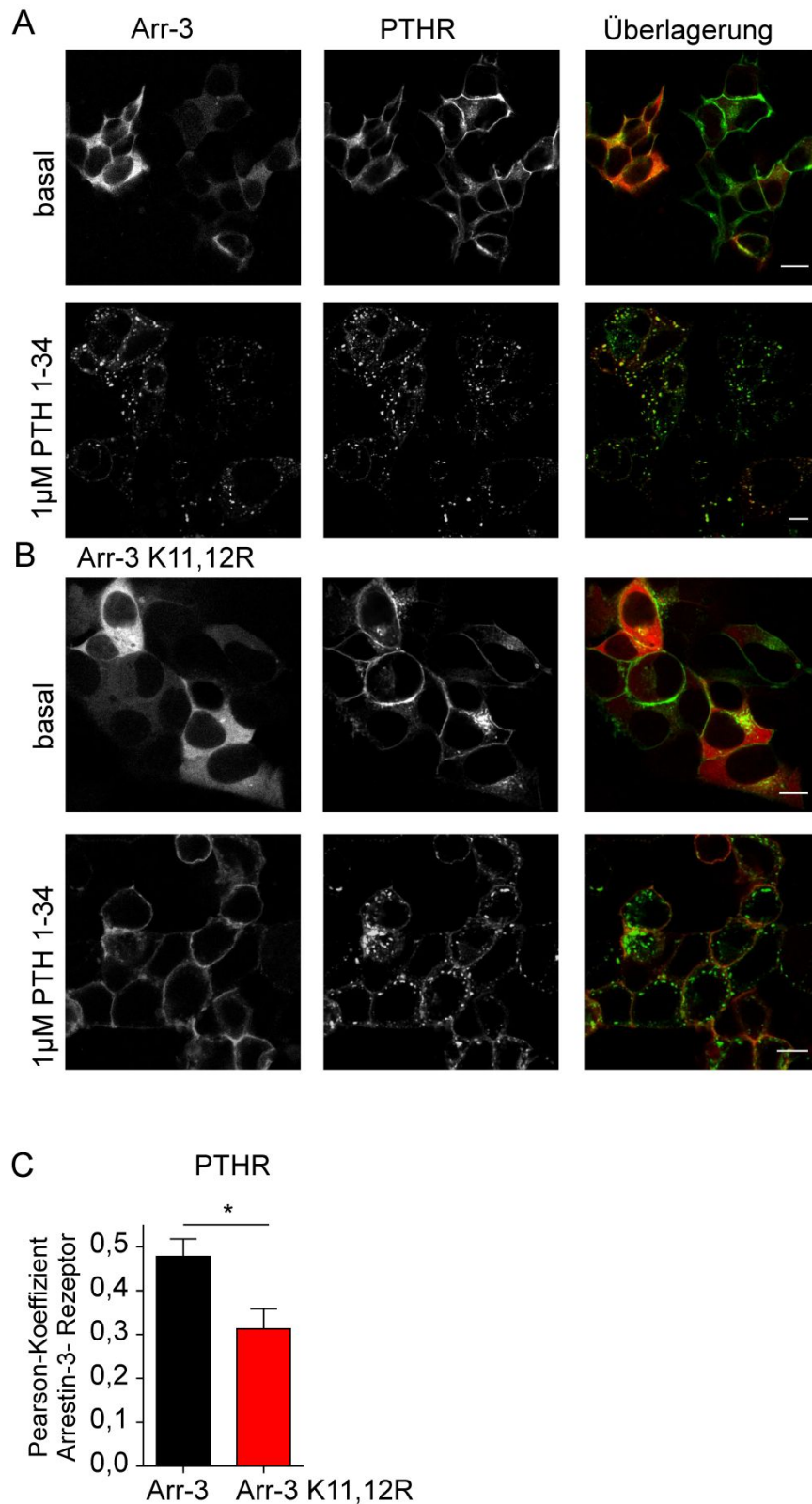


Abbildung 3.48: Rolle der K11,12R-Mutation bei der hPTH 1-34 vermittelten endosomalen Rekrutierung von Arrestin-3 Transient mit PTHr-YFP und Arrestin-3-CFP oder (B) Arrestin-3 CFP K11,12R sowie GRK2-transfizierte HEK293T-Zellen wurden 30 min mit 1 μ M hPTH 1-34 stimuliert und wie in Abbildung 3.46 beschrieben, untersucht. Die Skalierung entspricht 10 μ m. (C) Kolokalisation nach Pearson \pm SEM, (Arrestin-3 n=11, Arrestin-3 K11,12R n=18, erhalten aus zwei unabhängigen Experimenten); t-Test nach Student p=0,0195.

3.4 Ergebnisanhang

Tabelle 3.7: Alle proteinogenen Aminosäuren und ihre durchschnittlichen Massen. Bei jeder Aminosäure wurde die Masse von H₂O bereits abgezogen, daher beziehen sich die Angaben auf die Masse der Aminosäuren, wie sie in Peptiden vorkommen.

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	Masse in u (Durchschnitt)
Alanin	ALA	A	71.09
Arginin	ARG	R	156.19
Asparagin	ASN	N	115.09
Asparaginsäure	ASP	D	114.11
Cystein	CYS	C	103.15
Glutamin	GLN	Q	128.14
Glutaminsäure	GLU	E	129.12
Glycin	GLY	G	57.05
Histidin	HIS	H	137.14
Isoleucin	ILE	I	113.16
Leucin	LEU	L	113.16
Lysin	LYS	K	128.17
Methionin	MET	M	131.19
Phenylalanin	PHE	F	147.18
Prolin	PRO	P	97.12
Serin	SER	S	87.08
Threonin	THR	T	101.11
Tryptophan	TRP	W	186.12
Tyrosin	TYR	Y	163.18
Valin	VAL	V	99.14

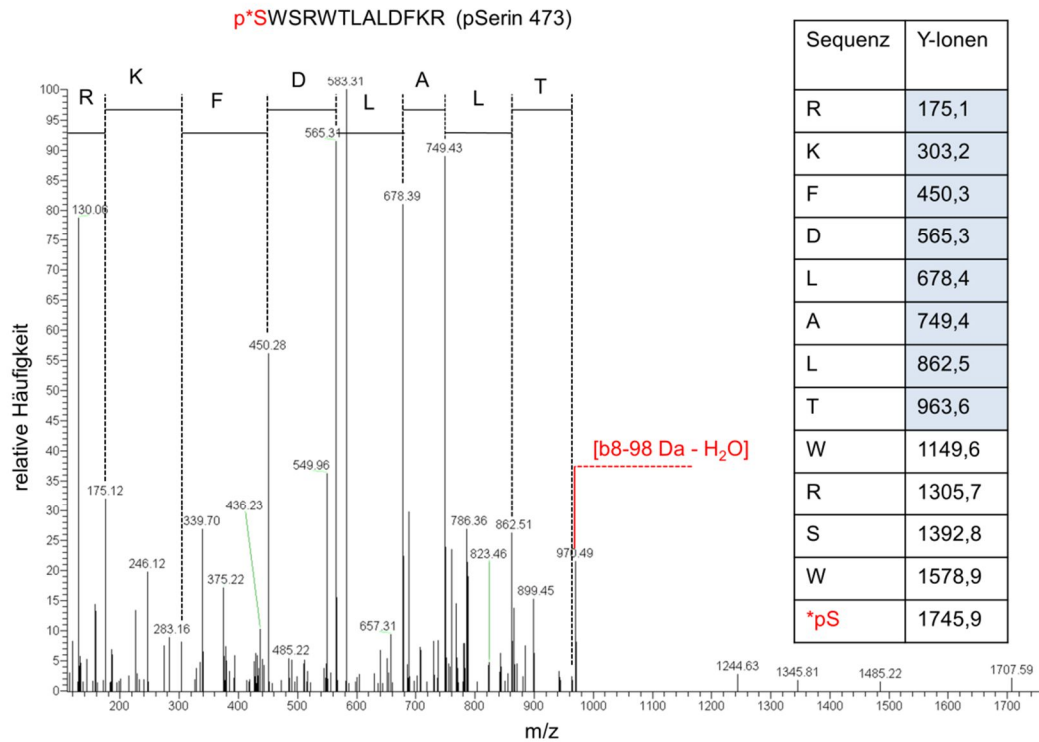


Abbildung 3.49: **MS/MS Spektrum des Phosphopeptids 473-SWSRWTLALDFKR-485 des humanen PTHR.** MS/MS Daten wurden mit der Datenbank UniProtKB / Swiss Prot mit Hilfe der Suchmaschine Mascot verglichen. Die relative Häufigkeit der Peptide wurde gegen (m/z) aufgetragen. In diesem Peptid wurde durch die Reduktion der Masse des b8-Ions um -98 m/z auf die Abspaltung eines H₂O- sowie auf die Abspaltung eines H₃PO₄-Moleküls geschlossen. Da sich aber zwischen Stelle b1-b8 drei mögliche Phosphorylierungsstellen befinden, kann die Lokalisation der phosphorylierten Aminosäure nicht exakt bestimmt werden. Y-Ionen wurden gestrichelt markiert und sind blau unterlegt in der Tabelle rechts angegeben.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wodurch die Affinität zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Arrestin-Proteinen bestimmt wird und wie sich Affinitätsänderungen auf zelluläre Prozesse wie z.B. die Internalisierung von Arrestin und Rezeptoren auswirken. Im ersten Teil wurde untersucht, wie die Einführung von zusätzlichen Phosphatgruppen in den β 2-adrenergen Rezeptor die Interaktion und zelluläre Lokalisation mit Arrestin beeinflusst. Im zweiten Teil wurden ligandenabhängige Phosphorylierungsstellen des humanen PTH1-Rezeptors identifiziert und ihr Einfluss auf die Interaktion und zelluläre Lokalisation mit Arrestin untersucht. Im dritten Teil konnte gezeigt werden, dass selbst konservative Mutationen in Arrestin die Affinität zu Rezeptoren und die zelluläre Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen beeinflussen.

4.1 Funktionelle Konsequenzen von zusätzlichen Phosphorylierungsstellen im β 2-adrenergen Rezeptor

Bei vielen GPCR führt die agonist-abhängige Rezeptorphosphorylierung zur Rekrutierung von Arrestin und zur anschließenden Internalisierung des Rezeptors (Gurevich and Gurevich, 2006). Arrestin kann entweder kurz nach der Internalisierung vom Rezeptor abdissoziieren oder zusammen mit dem Rezeptor in intrazelluläre Vesikel transportiert werden. Nach dieser Beobachtung wurden Rezeptoren nach ihrem Migrationsverhalten mit Arrestin klassifiziert. Klasse A Rezeptoren wie zum Beispiel β 2-adrenerge Rezeptoren, α 1b-adrenerge Rezeptoren oder μ -Opioidrezeptoren interagieren nur transient mit Arrestin an der Plasmamembran, während Klasse B Rezeptoren wie V2-Rezeptoren, Angiotensin1 Rezeptoren oder Neurokinin NK-1 Rezeptoren zusammen mit Arrestin in endozytotische Vesikel transportiert werden (Zhang *et al.*, 1999; Shenoy und Lefkowitz, 2003). Basierend auf Arbeiten mit Rezeptorchimären wurde diskutiert, dass dieses Transportmuster von der Anzahl der Serin-und Threoninreste im C-Terminus des Rezeptors abhängt (Oakley *et al.*, 1999, 2000; Pal *et al.*, 2013). Allerdings bewirkt der Austausch der C-Termini von Rezeptoren nicht nur die Veränderung der Arrestinbindung, sondern kann auch andere Eigenschaften wie zum Beispiel das Recycling von Rezeptoren beeinflussen (Cao *et al.*, 1999). Der C-Terminus des β 2AR interagiert beispielsweise mit Adapterproteinen wie Grb2 (Karooor *et al.*, 1998) und PDZ-Domänen-Bindeproteinen wie NHERF (Hall *et al.*,

1998). Daher wurde in dieser Arbeit der Ansatz einer moderaten Rezeptorveränderung gewählt, indem drei zusätzliche Serinreste in den β 2AR eingefügt wurden. Die Veränderung erfolgte zwanzig Aminosäuren unterhalb von TM7 durch den Austausch der Sequenz 361-GEQ-363 zu SSS. Diese Position relativ zur Plasmamembran wird im Vasopressin V2-Rezeptor durch drei Ser-Reste belegt (**Abbildung 3.1**). Es stellte sich heraus, dass der β 2AR SSS eine deutlich stärkere ligandenabhängige Totalphosphorylierung aufwies als der β 2AR (**Abbildung 3.5**). Um ausschließen zu können, dass allein die Veränderung des C-Terminus durch das Ersetzen der Aminosäuren GEQ die verstärkte Phosphorylierung bewirkte, wurde an gleicher Stelle ein Triple-Alanincluster eingefügt. Dieser Rezeptor zeigte einen ähnlich starken Anstieg der totalen Rezeptorphosphorylierung wie der Wildtyp-Rezeptor. Daraus konnte geschlossen werden, dass das SSS-Cluster spezifisch die Phosphorylierung verstärkt. Um Gewissheit darüber zu erlangen, ob die Phosphorylierung des β 2AR SSS tatsächlich innerhalb des inserierten Clusters erfolgte, wurde der phosphorylierte Rezeptor massenspektrometrisch untersucht. Der SSS-Cluster befand sich innerhalb eines Peptids mit 27 Aminosäuren, welches durch tryptischen Verdau erhalten wurde. Da bei massenspektrometrischen Untersuchungen ein Teil der Kollisionsenergie nicht nur zur Fragmentierung der Peptide, sondern auch zur Abspaltung von Phosphatgruppen oder Seitenketten verlorengelht, ist die Fragmentierung von Peptiden häufig unzureichend (Thingholm *et al.*, 2009). Im Fall des β 2AR SSS brach die Peptidsequenz nach y8 von C-terminaler Seite her ab (**Abbildung 3.4**). Da aber das doppelt geladene y10- bzw. y11-Ion eine Massenreduktion von 196 Da aufwies, konnte auf den Verlust von zwei Phosphorsäuremolekülen geschlossen werden. Der Verlust kann potentiell nach y7 (Tyrosin 366), nach y9 (natives Serin 364) oder nach y10 bzw. 11 (inseriertes Serin 362, 363) aufgetreten sein. Olsen *et al.* führten 2006 in vivo Phosphoproteomanalysen durch und fanden, dass die relative Häufigkeit von Phosphotyrosin:Phosphothreonin:Phosphoserin 1,8 %, 11,8 % und 86, 4 % beträgt (Olsen *et al.*, 2006). Nach Tyrosin 366 wurde kein Massenverlust, der auf die Abspaltung von Phosphorsäure hindeutete, detektiert, darüber hinaus findet die Phosphorylierung von Tyrosin selten statt. Es darf also angenommen werden, dass die Phosphorylierung innerhalb des inserierten SSS-Clusters detektiert wurde.

Die Interaktion des β 2AR, β 2AR SSS und der phosphorylierungsdefizienten Mutante β 2AR PD mit G $\beta\gamma$ (**Abbildung 3.6**) demonstriert die Funktionalität der Rezeptoren im Hinblick auf die Fähigkeit, G-Proteine konzentrationsabhängig zu binden. Obwohl die Rezeptorphosphorylierung durch die Interaktion mit Arrestin zur Desensibilisierung

beiträgt (Seibold *et al.*, 2000), wurden für alle getesteten Rezeptoren ähnliche EC_{50} Konzentrationen für Isoprenalin gemessen. In diesem Experiment wurden jedoch nur G-Proteine und Rezeptoren, aber nicht Arrestin und GRK überexprimiert. Darüber hinaus herrscht in heterologen Rezeptorexpressionsystemen eine große Rezeptorreserve, was bedeutet, dass für eine große Anzahl an Rezeptoren nur eine geringe Anzahl an G-Proteinen zur Verfügung steht. Diese Ergebnisse zeigen, dass vor allem die initiale Phase der G-Proteininteraktion nicht von der Desensibilisierung betroffen ist. Frühere *in vitro* Studien am $\beta 2AR$ konnten zeigen, dass die Rezeptorphosphorylierung allein nicht zu Desensibilisierung ausreicht. (Benovic *et al.*, 1987; Lohse *et al.*, 1992). Der $\beta 2AR$ SSS internalisierte stärker als der $\beta 2AR$ (**Abbildung 3.19**). Dies zeigt, dass die Phosphorylierung von Rezeptoren mit der Rezeptordesensibilisierung einhergeht.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze gewählt, um die Interaktion von Arrestin-3 mit Rezeptoren zu untersuchen: FRET zwischen Arrestin und Rezeptoren, die Bestimmung der Translokationsrate an die Plasmamembran, Zweifarben-FRAP, sowie die Visualisierung der Arrestinrekrutierung an die Plasmamembran oder auf Endosomen durch Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie. Mit der FRET-Methode können direkte Interaktionen und konformationelle Änderungen von Proteinen in hoher zeitlicher Auflösung erfasst werden. Mit der Zweifarben-FRAP Methode kann nicht zwischen einer direkten oder indirekten Interaktion zwischen Proteinen unterschieden werden. Da die Interaktion zwischen Arrestin und GPCR aber als spezifisch gilt, wurde in dieser Arbeit die Zweifarben-FRAP-Methode zur Untersuchung der Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen im stimulierten Zustand von verschiedenen GPCR untersucht.

Die Beobachtung der Arrestin-3-Rekrutierung an die Plasmamembran wurde mittels FRET in Echtzeit untersucht. Arrestin-3 wurde nach Stimulation des $\beta 2AR$, $\beta 2AR$ SSS, $\beta 2AR$ AAA oder $\beta 2V2R$ mit unterschiedlicher Kinetik rekrutiert (**Abbildung 3.7, Tabelle 3.1**). Die unterschiedlichen Rekrutierungskinetiken reflektieren vermutlich subtile Unterschiede der Rezeptorphosphorylierung durch GRK2. Während des Auswaschens des Liganden durchläuft der Rezeptor eine Konformationsänderung vom aktiven in den inaktiven Zustand. Hierbei unterliegt auch Arrestin einer Konformationsänderung und dissoziiert vom Rezeptor (Krasel *et al.*, 2005). Die Dissoziationskinetik von Arrestin-3 an einem typischen Klasse A-Rezeptor wie dem $\beta 2AR$ verlief schnell (**Abbildung 3.7**), wohingegen die Dissoziationskinetik am chimären Klasse B-Rezeptor $\beta 2V2R$ stark

verzögert war (**Abbildung 3.7**, Oakley *et al.*, 1999). Interessanterweise war die Interaktionszeit von Arrestin-3 am β 2AR SSS gegenüber dem β 2AR um den Faktor 2,5 verlängert. Darüber hinaus war das Ausmaß der Arrestinfraktion, die reversibel mit dem Rezeptor interagiert, am β 2AR SSS um 50 % gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor reduziert. Daraus geht hervor, dass Arrestin unterschiedliche Phosphorylierungszustände des Rezeptors erkennt und sich dies in der Dissoziationskinetik widerspiegelt, die hier in Echtzeit bestimmt wurde. Die Insertion des SSS-Clusters im distalen C-Terminus des β 2AR führte nicht zur Veränderung der Arrestin-3-Affinität verglichen zum Wildtyp-Rezeptor. Dies bestätigt, dass die für die Arrestininteraktion relevanten Phosphorylierungsstellen im proximalen C-Terminus lokalisiert sind (Krasel *et al.*, 2008).

Die Agonisten Isoproterenol und Adrenalin weisen schnelle Assoziations- und Dissoziationskinetiken am β 2-adrenergen Rezeptor auf (Rasmussen, Choi, *et al.*, 2011). Dies stellt die Voraussetzung für die Untersuchung der G-Protein- und Arrestininteraktion in dynamischen FRET-Messungen dar. Adrenalin weist eine etwas geringere Bindungsaffinität am β 2AR auf als Isoprenalin (Hoffmann *et al.*, 2004), beide Liganden führen aber zu gleich starker Phosphorylierung des proximalen β 2AR-C-Terminus (Trester-Zedlitz *et al.*, 2005). Daher ist das etwas höhere Ausmaß und die schnellere Rate der Arrestin-3-Dissoziation, die mit Adrenalin verglichen zu Isoprenalin am β 2AR beobachtet wurde, mit der geringeren Affinität von Adrenalin zum β 2AR zu begründen (**Abbildung 3.8 A, B, D**) (Krasel *et al.*, 2005). Trotzdem spiegeln sich bei Verwendung des natürlichen Liganden Adrenalin die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände des β 2AR, β 2AR SSS und β 2V2R im Dissoziationsverhalten von Arrestin-3 wider (**Abbildung 3.8 A, B, D**). Das schnellere Erreichen der Maximalamplitude der Arrestin-Rezeptorinteraktion (**Abbildung 3.8 A, C**) nach einer zweiten Agonistapplikation ist auf das „Phosphorylierungsgedächtnis“ des β 2AR zurückzuführen. Nach der Dissoziation des Liganden wird der Rezeptor nicht sofort vollständig dephosphoryliert, weshalb bei erneuter Rezeptorstimulation eine sehr schnelle Arrestin-3-Reassoziations an die Rezeptoren zu beobachten ist (Krasel *et al.*, 2008; Reiner *et al.*, 2009). Möglicherweise befindet sich Arrestin-3 nach Auswaschen der ersten Ligandenapplikation in einem präaktiven Zustand, der durch die anhaltende Phosphorylierung der Stellen aufrechterhalten wird, die für die initiale Arrestinaktivierung verantwortlich sind.

Visuelles Arrestin kann mit sehr geringer Affinität an β 2-adrenerge Rezeptoren binden, interagiert aber bevorzugt mit Rhodopsin (Gurevich *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 2000).

Klasse B Rezeptoren wie der V2R oder der $\beta 2V2R$ zeigen eine robuste Interaktion mit visuellem Arrestin, ohne jedoch die Sequestrierung von Rezeptoren auszulösen (Oakley *et al.*, 2000). In dynamischen FRET-Experimenten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass visuelles Arrestin eine schwache Interaktion mit dem $\beta 2AR$ aufwies, mit dem chimären $\beta 2V2R$ aber robust interagiert (**Abbildung 3.9**). Die Interaktion von visuellem Arrestin mit dem $\beta 2AR$ SSS war etwas stärker ausgeprägt als mit dem Wildtyp- $\beta 2AR$ (**Abbildung 3.9**). Da visuelles Arrestin nicht nur in der Retina, sondern auch in der Zirbelrüse und in peripheren Geweben wie in Herz, Lunge und Nieren exprimiert wird (Breitman *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994), ist davon auszugehen, dass die Interaktion mit Klasse B Rezeptoren in physiologischen Systemen relevant ist und durch die Lokalisation und das Ausmaß der Rezeptorphosphorylierung im C-Terminus reguliert wird.

FRET-Experimente zeigten, dass Arrestin-3 nach der Inaktivierung des $\beta 2AR$ SSS wesentlich langsamer vom Rezeptor dissoziierte als nach der Inaktivierung des $\beta 2AR$. Um die Arrestin-3-Affinität auch im aktivierten Zustand der Rezeptoren untersuchen zu können, wurde die von Dorsch *et al.*, 2009 etablierte Zweifarben-FRAP Methode eingesetzt. Diese ermöglichte die Messung der Dynamik von agonistbesetzten Arrestin-3-Rezeptorkomplexen in einzelnen lebenden Zellen (**Abbildung 3.15**). Die Arrestin-3-Mobilität wurde durch Fluoreszenzwiederkehr innerhalb eines kleinen irreversibel geblichenen Bereiches in der Membran bestimmt und reflektiert im Wesentlichen zwei Prozesse: Erstens die verbleibende Lateraldiffusion von Arrestin-3-Rezeptorkomplexen und zweitens die Dissoziation und anschließende Reassoziierung von Arrestin-3 an agonist-aktivierte Rezeptoren. Ob Arrestin dabei in den inaktiven Zustand übergeht und erst bei erneuter Rezeptorassoziierung aktiviert wird oder ob es im Übergangszustand eine präaktivierte Konformation einnimmt, kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Die schnelle Wiederkehr von Arrestin-3 in den geblichenen Bereich spricht dafür, dass mindestens 30-40 % der Arrestinfraktion vollständig vom aktivierten $\beta 2AR$ abdissoziieren und anschließend wieder reassoziieren kann. Somit sind Arrestin-3- $\beta 2AR$ -Komplexe selbst bei sättigenden Konzentrationen des Liganden nicht stabil. Am $\beta 2AR$ SSS und $\beta 2V2R$ weist die Verlangsamung und die Reduktion der Arrestin-3-Wiederkehr auf eine erhöhte Stabilität der Arrestin-3-Rezeptorkomplexe hin (**Abbildung 3.15**). Aus den kinetischen Parametern der Arrestin-3-Interaktion mit dem $\beta 2AR$ SSS kann geschlossen werden, dass die Phosphorylierung des zusätzlichen Serinclusters die Stabilität der Arrestin-Rezeptorkomplexe um den Faktor 2-4 erhöht. FRET- und FRAP-Experimente

konnten somit zeigen, dass die zeitliche Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen durch das Ausmaß und möglicherweise auch durch das Muster der Phosphorylierung im proximalen C-Terminus bestimmt wird.

Die Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen spiegelte sich nicht nur in kinetischen Untersuchungen wider, sondern wirkte sich auch auf die zelluläre Lokalisation dieser Komplexe aus. Die proximale Insertion des SSS-Clusters im $\beta 2AR$ schaltete den Arrestin-3-Transport vom typischen Klasse A-Muster auf Klasse B um und führte zur endosomalen Rekrutierung von Arrestin-3 mit $\beta 2AR$ SSS. Die Beurteilung der Rezeptor bzw. Arrestininternalisierung mittels Konfokalmikroskopie stellt einen semiquantitativen Ansatz dar. Um trotzdem relative Unterschiede im Ausmaß der endosomalen Arrestinrekrutierung quantifizieren zu können, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient vor und nach Stimulation der Rezeptoren zur Beurteilung herangezogen. Während Arrestin-3 nur wenig Kolokalisation mit dem $\beta 2AR$ in Plasmamembranbereichen aufwies, zeigten der $\beta 2V2R$ und der $\beta 2AR$ SSS Überlappungswerte mit Arrestin-3, die Rückschlüsse auf eine robuste Kolokalisation erlauben (**Abbildung 3.16**) (Bolte und Cordelières, 2006; Adler und Parmryd, 2007). Zusätzliche Experimente mit dem endosomalen Marker EEA1 bestätigten die Arrestinkolokalisation mit dem $\beta 2AR$ SSS auf Endosomen (**Abbildung 3.17**).

Es wird diskutiert, dass unterschiedliche Muster der Rezeptorphosphorylierung, die durch unterschiedliche GRK oder durch Stimulation mit verschiedenen Liganden hervorgerufen werden, zu verschiedenartigen Arrestinkonformationen führen können (Nobles *et al.*, 2011). Die räumliche Anordnung oder die Abfolge der Phosphate, welche die hochaffine Bindung von Arrestin am Rezeptor auslösen, ist aber bisher nicht bekannt und scheint in Anbetracht der vielen unterschiedlichen Muster von Phosphorylierungsstellen an unterschiedlichen Rezeptoren auch nicht konserviert zu sein. Ebenso wenig ist über die Interaktion struktureller Elemente von Rezeptoren mit Arrestin bekannt. Das Entfernen aller Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des $\beta 2AR$ führte zur massiven Abschwächung der Arrestin-3-Interaktion (**Abbildung 3.12**). Der verbliebene geringfügige Anstieg im FRET-Ratio, der mit dem phosphorylierungsdefizienten $\beta 2AR$ beobachtet wurde, kann allein auf die Rezeptoraktivierung zurückgeführt werden und wurde in ähnlicher Weise auch in früheren Studien für Rhodopsin beobachtet (Gurevich und Benovic, 1992). Die hochaffine Bindung von Arrestin an den $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor erfordert aber sowohl die Aktivierung als auch die Phosphorylierung des Rezeptors (Krasel

et al., 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Affinität von Arrestin-3 zum β 2AR PD durch die Einführung von zwei, drei bzw. fünf Phosphorylierungsstellen sukzessive zurückgewonnen werden konnte. Dabei scheint es für die niedrigaffine Arrestininteraktion keine Rolle zu spielen, in welcher Position sich die Phosphorylierungsstellen befinden, da das Ausmaß der Arrestininteraktion mit dem β 2AR 2S und β 2AR 3S ähnlich war (**Abbildung 3.12**). Die Kombination des SSS-Clusters mit Serin 355, 356 (β 2AR 5S) verstärkte die Arrestininteraktion. Allerdings war die Arrestin-Affinität dieses Rezeptors, der fünf Serine (zwei natürliche und drei inserierte) im proximalen C-Terminus aufwies, verglichen zum β 2AR SSS (welcher vier natürliche und die drei inserierten Serine enthielt) geringer (vgl. **Abbildung 3.12** mit **Abbildung 3.7**). Daraus geht hervor, dass zur Änderung der Charakteristik des Rezeptors die Gesamtheit aller natürlich vorkommenden Serine und Threonine im proximalen C-Terminus des β 2AR zusätzlich zu den drei inserierten Serinen erforderlich ist.

Die hohe Stabilität von Arrestin-3- β 2AR SSS-Komplexen und der Nachweis der Phosphorylierung des inserierten SSS Clusters untermauern die These, dass die Anzahl der Phosphorylierungsstellen im C-Terminus die Affinität und das Transportverhalten von Arrestin determinieren. Doch obwohl der β 2AR SSS Klasse B-Verhalten bezüglich der Arrestininteraktion aufwies, war dies hinsichtlich seiner Recyclingeigenschaften nicht der Fall (**Abbildung 3.19**). Das schnelle Recycling des β 2AR wird vermutlich durch die Interaktion von NHERF mit Ser 411 und Interaktionen mit der PDZ Domäne im distalen C-Terminus des β 2AR vermittelt (Cao *et al.*, 1999). Da der distale C-Terminus im β 2AR SSS nicht verändert war, wäre eine Verlangsamung des Recyclings, wie es üblicherweise für Klasse B Rezeptoren beobachtet wird (Garland *et al.*, 1996; Oakley *et al.*, 1999), hier auch nicht zu erwarten gewesen. Basierend auf chimären β 2V2-Rezeptoren vermuteten frühere Studien jedoch, dass das langsame Recycling von Rezeptoren durch die Interaktion von Arrestin mit einem phosphorylierten SSS-Cluster im V2-Rezeptor vermittelt wird. Es wurde postuliert, dass die Phosphorylierung bestimmter Cluster die Dauer der Rezeptor-Arrestininteraktion bestimmt und die Resensitisierung von Rezeptoren reguliert (Innamorati *et al.*, 1998; Oakley *et al.*, 1999). Diese Arbeit konnte durch die Insertion eines SSS-Clusters in den β 2AR zeigen, dass die Dauer der Arrestininteraktion das Recycling der Rezeptoren nicht beeinflusste. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an β 2-Rezeptoren mit unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern zeigen, dass die Stabilität von Arrestin-3-Rezeptorkomplexen in Abhängigkeit der Anzahl phosphorylierbarer Reste im proximalen Rezeptor-C-Terminus variiert. Die Anzahl und

die Lokalisation von Phosphorylierungsstellen in β 2-adrenergen Rezeptoren bestimmen den Transport von Arrestin-Rezeptorkomplexen. Die Vermutung, dass bestimmte Phosphorylierungsmuster in Rezeptoren unterschiedliche Arrestinkonformationen auslösen, könnte zukünftig zum Beispiel durch Einzel-Molekül-FRET oder mit Arrestin-FRET-Sensoren überprüft werden. Durch die Variation von Phosphorylierungsmustern durch Einfügen oder Entfernen von Phosphorylierungsstellen kann die Rezeptorinteraktion mit dem Signalprotein Arrestin stufenweise erhöht oder herabgesetzt werden. Auf diese Weise könnten funktionelle Einflüsse von Arrestin-Rezeptor-Komplexen in verschiedenen Fragestellungen wie z.B. der Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von Rezeptoren, der Analyse von Rezeptor-Rezeptorinteraktionen oder von nachgeschalteten Signalkaskaden analysiert werden.

4.2 Identifikation und Quantifizierung ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen im PTHR

Die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch second messenger, zur Rezeptorphosphorylierung, zur Arrestinbindung und Rezeptordesensibilisierung. Frühere Studien an Opossum- oder Ratten-PTH-Rezeptoren zeigten, dass der PTHR im C-Terminus agonistabhängig phosphoryliert werden kann (Blind *et al.*, 1995, 1996; Malecz *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1998; Tawfeek *et al.*, 2002). Der klassische Ansatz der Identifikation ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen besteht in der sukzessiven Mutation potentieller Phosphorylierungsstellen. Durch RIPA oder 2D-Phosphopeptidmapping können vor allem quantitative Aussagen über die Rezeptorphosphorylierung getroffen werden (Brugge and Erikson, 1977; Meisenhelder *et al.*, 2001). Neuere Ansätze verfolgen Phosphoproteomanalysen mittels Tandem-Massenspektrometrie, wodurch Hinweise auf die Anzahl sowie die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen in Rezeptoren erhalten werden (z. B. Trester-Zedlitz *et al.*, 2005; Butcher *et al.*, 2011, 2014; Nobles *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde erstmals ein massenspektrometrischer Ansatz zur gezielten Identifikation ligandenabhängiger Phosphorylierungsstellen im humanen PTHR1 verwendet (Zusammenfassung aller Phosphorylierungsstellen s. **Tabelle 3.3, Abbildung 3.30**). Dabei wurde im C-Terminus die Phosphorylierung von S491, S504 gefunden. Diese beiden Serine wurden bereits in früheren Studien als ligandenabhängige Phosphorylierungsstellen identifiziert (Blind *et al.*, 1996; Tawfeek *et al.*, 2002). Die

Lokalisation der Phosphorylierung von S473, S492 und S493 konnte aufgrund unzureichender Peptidfragmentierung nicht exakt zugeordnet werden. Von der potentiellen Phosphorylierung dieser Aminosäuren wird aber in der Literatur berichtet (Blind *et al.*, 1996; Tawfeek *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurden drei bisher nicht beschriebene Phosphorylierungsstellen im C-Terminus stimulierter PTH-Rezeptoren identifiziert: T503, S519 und T547. T503 ist im proximalen C-Terminus lokalisiert und befindet sich in einem Bereich, der im Opossum-PTHr durch GRK2 phosphoryliert wird (Malecz *et al.*, 1998). S519 befindet sich im mittleren Abschnitt des C-Terminus und wird von einem prolinreichen Motiv flankiert: 517-PLSPRLLP-524. Konsensussequenzanalysen haben ergeben, dass dieses Motiv eine Erkennungssequenz für ERK1/2 oder cyclinabhängige Kinasen sein kann (Ubersax und Ferrell Jr, 2007). Die Mutation verschiedener prolinreicher Motive im C-Terminus des PTH1R führte zum Verlust der Src- und Arrestininteraktion mit dem PTHR und verminderte die ERK1/2-Aktivierung (Rey *et al.*, 2006). Ob die Phosphorylierung von S519 eine regulatorische Funktion für die Aktivität von Adapterproteinen erfüllt, muss noch untersucht werden. T547 im distalen C-Terminus des PTHR ist innerhalb einer sogenannten PEST-Sequenz lokalisiert 539-KPGTPALETLETPPAMAAPK-559 (Shimada *et al.*, 2005). PEST-Regionen regulieren den proteolytischen Abbau von Proteinen (Rogers *et al.*, 1986). Die funktionellen Auswirkungen der Phosphorylierung im distalen C-Terminus des PTHR sind bisher nicht charakterisiert worden. Da die Phosphorylierung von T547 nur einmal detektiert wurde spielt sie vermutlich nur eine untergeordnete oder transiente regulatorische Rolle. Die Phosphorylierung von T551 im distalen C-terminus des PTHR wurde insgesamt fünfmal detektiert (**Tabelle 3.3**) und ist bereits zuvor in einer großformatigen Untersuchung des humanen Leberphosphoproteoms identifiziert worden (Bian *et al.*, 2014) und (<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=5616&showAllSites=false>). Überraschend war, dass Phosphoserin 73 im extrazellulären N-Terminus des PTHR detektiert wurde. Die Phosphorylierung von S73 im PTHR wurde bereits zuvor durch massenspektrometrische Untersuchungen in T-Lymphozyten gefunden und ist in einer Datenbank aufgeführt (<http://www.phosphosite.org/siteAction.do?id=15427892#1>). Wie kann die Phosphorylierung eines Proteins im Extrazellularraum stattfinden? Für zahlreiche Proteine wurde bereits über die extrazelluläre Tyrosinphosphorylierung berichtet (Ballif *et al.*, 2008; Hornbeck *et al.*, 2012), doch lange Zeit war kein Mechanismus für die extrazelluläre Phosphorylierung bekannt. Vor kurzem aber wurde in Thrombozyten und in 293T-Zellen die extrazelluläre Sekretion der Tyrosinkinase VLK entdeckt und die

Kinaseaktivität im Extrazellulärraum konnte nachgewiesen werden (Bordoli *et al.*, 2014). Ob auch Serin-, oder Threoninkinasen in den Extrazellulärraum sekretiert werden können, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Da die Phosphorylierung von S73 nur einmal detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um eine instabile oder transiente Modifikation handelt. Die funktionelle Charakterisierung von Phosphoproteinen die nur in substöchiometrischen Mengen gefunden werden, stellt eine große analytische Herausforderung dar.

Zur quantitativen Analyse der Proteinphosphorylierung stehen neben massenspektrometrischen „Multi reaction monitoring“-Analysen (Wolf-Yadlin *et al.*, 2007) noch konventionelle 2D-Phosphopeptidmapping-Methoden oder Radioimmunpräzipitationsassays zur Verfügung. Um den Anteil der Gesamtphosphorylierung der verschiedenen Serin- und Threonincluster im PTHR zu ermitteln, wurde die ^{32}P -Inkorporation in Radioimmunpräzipitationsassays bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass der Bereich 489-SGSSSYS-495 etwa 50 % der ligandenabhängigen, PKA-unabhängigen Gesamtphosphorylierung des PTHR ausmacht (**Abbildung 3.32**). Auch in einer früheren Studie wurde gezeigt, dass dieses Motiv im PTHR stark phosphoryliert wird (Qian *et al.*, 1998). Das Motiv 501-SHTSVT-506 hat nur etwa 30 % Anteil an der Gesamtphosphorylierung des PTHR (**Abbildung 3.32**). Die Alaninmutation aller Serine und Threonine im Bereich S489-T506 (PD 3) reduzierte die ligandenabhängige Phosphorylierung des PTHR nur um etwa 60 % (**Abbildung 3.32**). Tawfeek *et al.*, konnten am Opossum-PTHr ebenfalls zeigen, dass die Mutation von sieben Serin/Threoninresten im Bereich S489-S504 die Phosphorylierung des PTHR nicht vollständig inhibiert. Daraus geht hervor, dass noch weitere Serin- und Threoninreste im distalen C-Terminus oder in der 3.intrazellulären Schleife agonistabhängig phosphoryliert werden können. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten MS/MS-Experimenten wurde S519 sehr oft als Phosphorylierungsstelle gefunden, aber auch Phosphothreonin 551 wurde mehrfach identifiziert (Tabelle 3.3). Somit kann die verbleibende Phosphorylierung, die mit der PTHR-Mutante PD 3 beobachtet wurde, unter anderem durch die Phosphorylierung von S519 und T551 im distalen PTHR-C-Terminus erklärt werden.

4.2.1 Funktionelle Bedeutung proximaler Phosphorylierungsstellen im PTHR.

Das Ausmaß der Rezeptorphosphorylierung bestimmt die Interaktion mit Arrestin. Da der Bereich 489-SGSSSYS-495 im PTHR stark phosphoryliert wurde, wurde vermutet, dass die Mutation der Serine innerhalb dieses Clusters die Interaktion mit Arrestin-3 beeinträchtigt. Tatsächlich war dies auch der Fall (**Abbildung 3.33**, PTHR PD1). In FRAP Experimenten hingegen, war mit der PTHR PD1-Mutante nur eine geringe Erhöhung in der Arrestin-3 Mobilität im Vergleich zum Wildtyp-PTHR zu beobachten (**Abbildung 3.35**). Dies deutet darauf hin, dass der Bereich 489-496 im PTHR zwar das Ausmaß der initialen Arrestinrekrutierung beeinträchtigt, aber Arrestin-3 immer noch mit hoher Affinität binden kann. Die Untersuchung der zellulären Lokalisation von Arrestin-3 bestätigte diesen Befund (**Abbildung 3.38 B**). Obwohl der Bereich S501-T506 im C-Terminus des PTHR vergleichsweise schwach phosphoryliert wurde (**Abbildung 3.32**), führte die Mutation der Serine und Threonine zu Alanin in diesem Bereich zur massiven Reduktion der Interaktion mit Arrestin-3 (**Abbildung 3.33 PD2**, **Abbildung 3.35**). Trotzdem tauchte Arrestin-3 nach der Stimulation mit hohen hPTH 1-34-Konzentrationen mit diesem Rezeptor in endosomalen Vesikeln auf (**Abbildung 3.39**). Um die Auswirkungen des Serin/Threoninclusters zwischen S501 und T506 genauer zu analysieren, wurden nur T503 und S504, die zuvor in MS/MS Untersuchungen als Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden (**Abbildung 3.26**), zu Alanin mutiert. Wider Erwarten reduzierte die Mutation von nur zwei Phosphorylierungsstellen im PTHR die Rezeptorinteraktion mit Arrestin-3 ebenso stark wie die Mutante PD5, in welcher 18 potentielle Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert wurden (**Abbildung 3.33**). Es wurde nicht überprüft, ob die Mutation von T503 und S504 zu Alanin die Phosphorylierung von S501 und T506 beeinträchtigt. Da aber die Mutation des gesamten Clusters die Totalphosphorylierung des PTHR nur um 30 % reduziert, wären geringfügige Unterschiede, die sich bei der sukzessiven Mutation dieses Clusters ergeben könnten, schwierig herauszuarbeiten. In dieser Arbeit konnte weder in FRAP- noch in FRET-Messungen der Aktivierungszustand von Arrestin-3 untersucht werden. Daher muss die Vermutung, dass die Phosphorylierung von T503 und S504 eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Arrestin-3 am PTHR spielt, z. B mit Arrestin-3-Sensoren oder strukturbasierten Untersuchungen (Sommer *et al.*, 2015) überprüft werden. Die Untersuchungen der Arrestininteraktion mit phosphorylierungsdefizienten PTHR ergaben, dass vor allem die Phosphorylierung im proximalen C-Terminus essentiell für die

Interaktion mit Arrestin-3 ist. In dieser Hinsicht gleicht der PTHR dem β 2AR (Krasel *et al.*, 2008; Zindel *et al.*, 2015). Die Interaktion eines phosphorylierungsdefizienten β 2AR mit Arrestin war jedoch praktisch kaum messbar (Krasel *et al.*, 2008; Zindel *et al.*, 2015). Der PTHR hingegen wies zwar nach der Mutation von 18 potentiellen Phosphorylierungsstellen eine gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor drastisch verminderte, aber dennoch robuste Arrestin-3-Rekrutierung auf. (**Abbildung 3.33**, **Abbildung 3.40**). Dies bestätigt frühere Untersuchungen mit einem C-terminal trunkierten PTH-Rezeptor, der trotz der Abwesenheit von Phosphorylierungsstellen im C-Terminus Arrestin noch schwach rekrutieren konnte. Daraus lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ableiten: Einerseits könnten Strukturelemente des PTHR durch die Konformationsänderung nach Rezeptoraktivierung eine niedrigaffine Arrestinbindung, wie sie zum Beispiel PTHR PD2 oder PD3 beobachtet wurde, auslösen. Andererseits könnten auch Phosphorylierungsstellen in der dritten intrazellulären Schleife oder phosphomimetische Aminosäuren wie Glutamat im Rezeptor-C-Terminus oder in der dritten intrazellulären Schleife die Aktivierung von Arrestin übernehmen. Der Phosphatsensor (Hirsch *et al.*, 1999) und phosphatsensitive Elemente (Gurevich und Benovic, 1995; Hanson und Gurevich, 2006) sind in verschiedenen Arrestinisoformen untersucht worden. Das Standardmodell der Arrestinaktivierung involviert aber nicht nur den „Phosphatsensor“, sondern auch den „Aktivierungssensor“, der den aktivierten Rezeptor erkennt. Es wurde vermutet, dass der Aktivierungssensor zwischen Kontaktpunkten des N- und des C-Terminus lokalisiert ist, da diese die einzigen stabilisierenden intramolekularen Elemente in Arrestin sind, die nicht von der Phosphatinteraktion betroffen sind (Hanson and Gurevich, 2006). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die „finger loop“ in Arrestin mit Transmembrandomänen von Rezeptoren in Kontakt tritt (Shukla *et al.*, 2014; Szczepek *et al.*, 2014). Es ist vorstellbar, dass die PTHR-Aktivierung zur Präaktivierung von Arrestin-3 beiträgt und dadurch eine niedrigaffine Interaktion mit dem Rezeptor, vermittelt durch die „finger loop“, hervorruft.

Mit dem PTH-Analogon D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 wurde die Induktion arrestin-selektiver Signalwege und nach Langzeitgabe die Erhöhung der trabekulären Knochendichte beobachtet (Gesty-Palmer *et al.*, 2006, 2009, 2013; Maudsley *et al.*, 2015). Daher wurde dieser Ligand in dieser Arbeit in Phosphorylierungs- und Arrestin-Rekrutierungsexperimenten eingesetzt. D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 löste keine Phosphorylierung des PTH-Rezeptors aus und führte nicht zur Rekrutierung von Arrestin-3 (**Abbildung 3.41**, **Abbildung 3.42**). Auch in anderen Studien konnte die Aktivierung von Arrestin-3 durch D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34 nicht festgestellt werden (Cupp *et al.*, 2013;

van der Lee *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte keine arrestinabhängige ERK1/2-Aktivierung durch diesen Liganden festgestellt werden (Cupp *et al.*, 2013). Die Gabe von PTH 7-34 führt nicht zur Erhöhung der Knochendichte in Tiermodellen (Sebastian *et al.*, 2015). Daher bedarf es noch weiterer Untersuchungen am PTHR, um funktionell selektive Liganden ausfindig zu machen und therapeutisch erfolgreich zu nutzen.

4.3 Die Rolle positiv geladener Aminosäuren als Phosphaterkennungssensoren im β -Faltblatt 1 in Arrestin-3

Das Modell der Arrestinaktivierung wurde zuerst an Rhodopsin entwickelt und beschreibt im ersten Schritt die Interaktion zweier phosphorylierter Stellen in Rhodopsin mit Lysin-14, und -15 im β -Faltblatt 1 von Arrestin-1 (visuelles Arrestin). Durch eine Seitwärtsverschiebung im β -Faltblatt 1 wird die 3-Element-Interaktion aufgehoben (**Abbildung 1.4**), die Arrestin in der inaktiven Konformation stabilisiert und die Überführung der Phosphate in Richtung des polaren Kerns wird ermöglicht (Vishnivetskiy *et al.*, 2000). Dadurch wird eine Salzbrücke, die R175 (R170 in Arrestin-3) im polaren Kern bildet, aufgebrochen und der C-Terminus des nun aktivierten Arrestins wird frei (Hanson *et al.*, 2006; Vishnivetskiy *et al.*, 2010), um für die Interaktion mit Adaptermolekülen wie Clathrin und AP-2 zur Verfügung zu stehen (Goodman *et al.*, 1996). Diese Interaktionen spielen für Arrestin-2 und Arrestin-3 eine wichtige Rolle bei der Rezeptorinternalisierung. In visuellem Arrestin führt die Mutation von K14 und K15 zu A zum Verlust der Interaktion mit Rhodopsin (Vishnivetskiy *et al.*, 2000). Sequenzvergleiche ergeben, dass alle Arrestine im N-terminalen β -Faltblatt 1 zwei streng konservierte Lysine aufweisen (**Abbildung 4.1**). So könnte man vermuten, dass die Arrestinaktivierung über die zwei N-terminalen Lysine, die als primäre Phosphat-Erkennungssensoren in visuellem Arrestin gelten (Vishnivetskiy *et al.*, 2000), für alle Arrestine gleich abläuft. Doch die Neutralisierung der Ladung der beiden vicinalen Lysine in Arrestin-2, oder -3 hat keinerlei Auswirkungen auf die Rekrutierung an den β 2AR, den M2AR oder den D2R in BRET-Experimenten (Gimenez *et al.*, 2012). Eine andere Arbeit postulierte, dass die spezifische Ubiquitinierung der beiden vicinalen Lysine K11, 12 die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen Arrestin-3 und dem Angiotensin 1 Rezeptor (AT1R) hervorruft. Die konservative Mutation von Lysin 11 und 12 zu Arginin (K11,12R) führte zum Verlust der stabilen Ubiquitinierung (Shenoy und Lefkowitz, 2005).

Arr-1 (1) MKANKPAPNHVIFKKISRDK (20)
Arr-2 (1) MGDKGTRVFKKASPNG (16)
Arr-3 (1) MGEKPGTRVFKKSSPNC (17)

Abbildung 4.1: Sequenzvergleich von β -Faltblatt 1 im N-Terminus von Arrestin-1,-2, und -3. Die konservierten Lysine sind rot markiert.

In dieser Arbeit wurde die Affinität von Arrestin-3 K11,12R mit der Affinität von Wildtyp-Arrestin-3 zu einem Klasse A- und mehreren Klasse B-Rezeptoren mit unterschiedlichen Methoden verglichen. Der β 2AR als Vertreter der Klasse A-Rezeptoren zeigte ebenso wie der β 2V2R, der β 2AR SSS und der PTHR als Vertreter der Klasse B-Rezeptoren eine robuste Rekrutierung von Arrestin-3 K11,12R nach Rezeptorstimulation (**Abbildung 3.43**, **Abbildung 3.46**, **Abbildung 3.47**, **Abbildung 3.48**). In vielen Studien werden BRET-basierte Untersuchungen zur Beurteilung der Rezeptor-Arrestininteraktion herangezogen (Bertrand *et al.*, 2002; Vrecl *et al.*, 2004; Gimenez *et al.*, 2012). Doch mit dieser Methode kann nur eingeschränkt zwischen initialer Arrestintranslokation und der Arrestinaffinität zum aktivierten, phosphorylierten Rezeptor unterschieden werden. Meistens werden durch BRET-Messungen vor allem relative Unterschiede im Ausmaß der Arrestin-Translokation an aktivierte Rezeptoren erfasst. Mit Hilfe dynamischer FRET-Messungen ist es jedoch möglich, zunächst die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Arrestinrekrutierung nach der Rezeptoraktivierung zu bestimmen. Durch die Inaktivierung der Rezeptoren können anschließend Dissoziationsraten von Arrestin ermittelt werden, die Aufschluss über die Affinität zum phosphorylierten Rezeptor geben. Bei der Ermittlung der Dissoziationsraten stellte sich überraschenderweise heraus, dass Arrestin-3K11,12R vom β 2AR und β 2AR SSS doppelt so schnell dissoziierte wie Arrestin-3. Darüber hinaus war die Interaktion von Arrestin-3K11,12R mit dem β 2AR vollständig reversibel, die Arrestin-3- β 2AR-Komplexbildung hingegen war nur zu etwa 70 % reversibel. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass ein Teil der β 2AR zusammen mit Arrestin-3 schon nach dreiminütiger Stimulation in Vesikeln akkumuliert, während die Vesikelakkumulation von Arrestin-3K11,12R mit dem β 2AR verzögert stattfindet und deshalb mehr Rezeptoren durch Entfernung des Liganden inaktiviert werden können. Die Anreicherung von Arrestin-Rezeptorkomplexen in Vesikeln wird vermutlich durch das Zusammenspiel verschiedener posttranslationaler Modifikationen wie Ubiquitinierung (Shenoy und Lefkowitz, 2003), Phosphoinositidbindung (Gaidarov *et al.*, 1999) und Dephosphorylierung von Arrestin (Lin *et al.*, 1997, 2002) beeinflusst. Die Interaktion von

Arrestin-3K11,12R mit dem β 2AR SSS war deutlich stärker und doppelt so schnell reversibel als die Interaktion von Arrestin-3 mit dem β 2AR SSS (**Abbildung 3.43**). Allerdings konnte an diesem Rezeptor nicht die Dissoziationsgeschwindigkeit von Arrestin-3K11,12R am β 2AR erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass Arrestin-3K11,12R unterschiedliche Phosphorylierungszustände von Rezeptoren erkennen kann. Dass dies der Fall ist, zeigten auch Messungen am β 2V2R. Auch an diesem Rezeptor, welcher wie der β 2AR SSS (**Abbildung 3.4**, **Abbildung 3.5**, (Zindel *et al.*, 2015)) stärker phosphoryliert wird als der β 2AR (Oakley *et al.*, 1999), war das Ausmaß der Arrestin-3K11,12R Dissoziation verglichen mit Arrestin-3 etwa verdoppelt. Die Geschwindigkeit der Arrestin-3 K11,12R-Dissoziation von diesem Rezeptor war verglichen mit Arrestin-3 nur leicht erhöht.

In Abhängigkeit des Ausmaßes der Rezeptorphosphorylierung variierte das Ausmaß der Rezeptor-Interaktion von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R. Dabei war die Zunahme der Interaktionsstärke von Arrestin-3 K11,12R am jeweils betrachteten Rezeptor stets um eine Stufe schwächer als für Arrestin-3. Wodurch kommt die Reduktion der Stabilität von Arrestin-3 K11,12R-Rezeptorkomplexen zustande? **Abbildung 4.2** zeigt, dass K10 und 11 (entsprechen K 11,12 in Arrestin-3) in der Kristallstruktur von Arrestin-2 mit einem Phosphopeptid des Vasopressin Typ2 Rezeptors (V2pp) interagieren. Außerdem sind noch weitere Lysinreste aus der α Helix I und der Lassostruktur sowie ein Argininrest aus dem β -Faltblatt I an der Bildung von ionischen Wechselwirkungen zum Phosphopeptid beteiligt. Dies zeigt einerseits, dass Lysin 11 und 12 in Arrestin-3 eine Rolle für die Interaktion mit Phosphaten spielen könnten, andererseits geht aus der Struktur hervor, dass noch weitere positiv geladene Aminosäuren in Arrestin an der Ausbildung ionischer Wechselwirkungen mit Phosphatresten beteiligt sind und diese somit die Interaktion stabilisieren. Durch die Mutation von K zu R (Lysin zu Arginin) bleibt zwar die Ladung erhalten, aber die Ammoniumgruppe in Lysin wird durch die größere Guanidingruppe in Arginin ersetzt und führt möglicherweise zu sterischen Problemen bei der Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen. Somit könnte die Mutation von K11, 12 zu R in Arrestin-3 eine Beeinträchtigung der Interaktion von rezeptorgebundenen Phosphaten mit sich bringen. Dass die beiden Lysinreste wie früher vermutet eine direkte Rolle bei der Ubiquitinierung spielen (Shenoy und Lefkowitz, 2003), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Es ist allerdings vorstellbar, dass Arrestin-3 K11,12R an bestimmten Rezeptoren eine Konformation einnimmt, die Unterschiede in der Ubiquitinierung an anderen Stellen im Arrestinmolekül bewirkt.

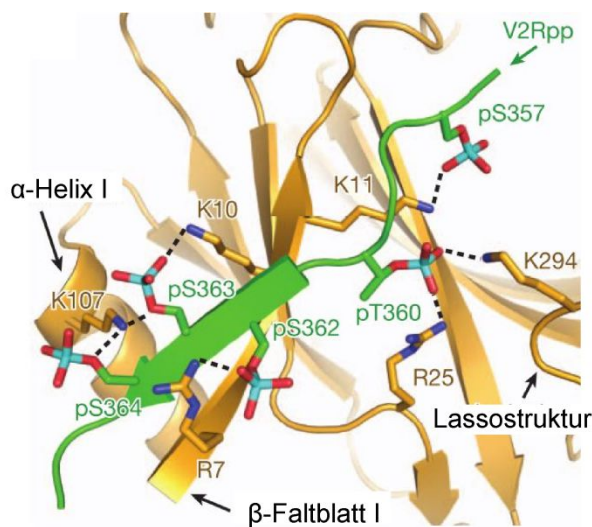


Abbildung 4.2: Lysine in β -Faltblatt I interagieren mit negativ geladenen Phosphaten eines Phosphopeptids. (PDB: 4JQI) K10, 11 in aktiviertem Arrestin-2 (entspricht K11, 12 in Arrestin-3) interagieren mit einem Phosphopeptid des V2R (V2Rpp). Darüber hinaus sind noch weitere Lysinreste aus α -Helix I und der Lassostruktur sowie ein Argininrest aus β -Faltblatt I an der Bildung von „Salzbrücken“ zum Phosphopeptid beteiligt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Shukla *et al.*, 2013.

Der natürliche Ligand des humanen, PTH1R, hPTH 1-34 ist nicht auswaschbar, weshalb Arrestin-Dissoziationsraten nicht durch FRET-Experimente bestimmt werden können. Um trotzdem die Stabilität von Arrestin-3 K11,12R mit einem Klasse B Rezeptor im agonistgebundenen Zustand beurteilen zu können, wurde die Zweifarben-FRAP-Methode verwendet. Die Komplexbildung zwischen Arrestin-3 und dem PTHR nach Stimulation mit hPTH1-34 war irreversibel. Die gemessene Arrestin-3 Wiederkehr von etwa 20 % lässt sich auf die Lateraldiffusion nicht immobilisierter PTH-Rezeptoren zurückführen. Demgegenüber waren das Ausmaß und die Geschwindigkeit der mobilen Fraktion von Arrestin-3 K11,12R gegenüber Arrestin-3 am PTH-R etwa verdoppelt (**Abbildung 3.44**). Dies zeigt, dass Arrestin-3 K11,12R innerhalb des beobachteten Zeitraumes vom PTHR abdissoziiert und die Bildung eines stabilen Komplexes durch den Austausch von Lysin gegen Arginin in Position 11 und 12 von Arrestin-3 verhindert wird. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden auch für die Interaktion von Arrestin-3 K11,12R am β 2V2R gemacht (**Abbildung 3.45**).

Arrestin-3 K11,12R bildet mit dem β 2AR SSS, dem β 2V2R, und dem PTHR Komplexe, deren zeitliche Stabilität verglichen mit Arrestin-3-Komplexbildung an diesen Rezeptoren

verringert ist. Dies beeinflusste auch die Kompartimentalisierung dieser Rezeptoren mit Arrestin. Die Kolokalisation von Arrestin-3 K11,12R auf Endosomen mit dem β 2AR SSS und β 2V2R war verringert, aber nicht aufgehoben (**Abbildung 3.46 B, C**, **Abbildung 3.47 B, C**). Wider Erwarten war der endosomale Kotransport von Arrestin-3 mit dem PTHR durch die Mutation K11,12R gänzlich aufgehoben (**Abbildung 3.48 B**). Die verbliebene Kolokalisation, die mit dem Pearson Korrelationskoeffizient ermittelt wurde, resultierte aus Arrestin-Rezeptorkomplexen an der Plasmamembran (**Abbildung 3.48 B, C**). Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgendes ableiten: Erstens spielen die beiden Lysine K11,12 in Arrestin-3 keine ausschlaggebende Rolle für die initiale Rezeptorerkennung von Arrestin-3 (Gimenez *et al.*, 2012, **Abbildung 3.43**). Zweitens wurde durch FRET- und FRAP-Experimente ein unerwarteter Einfluss für K11,12 in Arrestin-3 bei der Bildung von stabilen Rezeptorkomplexen durch die Interaktion mit phosphorylierten Stellen im Rezeptor gefunden (**Abbildung 3.43**, **Abbildung 3.44**, **Abbildung 3.45**). Drittens ist die Rolle der beiden Lysine 11 und 12 in Arrestin-3 bei der Erkennung von Rezeptorphosphaten im Hinblick auf die Kompartimentalisierung von Arrestin-Rezeptorkomplexen nicht für alle Rezeptoren einheitlich. Während der AT1R (Shenoy und Lefkowitz, 2005) und der PTHR (**Abbildung 3.48**) nur transient mit Arrestin-3K11,12R an der Plasmamembran interagieren, können der V2R, der NK1R (Shenoy und Lefkowitz, 2005) oder der β 2V2R (**Abbildung 3.47**) mit Arrestin-3 K11,12R in endosomale Vesikel rekrutiert werden. Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass Arrestin rezeptorspezifische Komplexe ausbilden kann (Shenoy und Lefkowitz, 2005; Vishnivetskiy *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnte erstens gezeigt werden, dass zusätzliche Phosphorylierungsstellen im proximalen Rezeptor C-Terminus des β 2AR die Interaktion mit Arrestin verstärken und so das Transportmuster von Arrestin-Rezeptorkomplexen umschalten können. Je mehr Phosphorylierungsstellen im proximalen C-Terminus von Rezeptoren vorhanden sind, desto affiner verläuft die Interaktion mit Arrestin.

Zweitens wurden in dieser Arbeit drei bisher nicht bekannte Phosphorylierungsstellen im humanen PTH1 Rezeptor identifiziert. Darüber hinaus wurden die Phosphorylierungsstellen, die die hochaffine Arrestinbindung des PTHR vermitteln, identifiziert. Aus den Untersuchungen mit phosphorylierungsdefizienten PTH-Rezeptoren ging hervor, dass die niedrigaffine Interaktion mit Arrestin phosphorylierungsunabhängig stattfindet.

Drittens konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass trotz der Modifikation phosphatsensitiver Elemente in Arrestin-3 die Interaktion mit verschiedenen Rezeptormutanten stattfinden kann, jedoch mit verringerter Affinität. Die Reduktion der Affinität wirkt sich je nach Rezeptor unterschiedlich auf den Kotransport von Arrestin-Rezeptorkomplexen aus.

4.4 Perspektiven

Aus den Unterschieden in der zeitlichen Stabilität und räumlichen Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen in Abhängigkeit der Rezeptorphosphorylierung ergeben sich einige Fragen: Wie sieht die Konformation von Arrestin an unterschiedlichen Rezeptoren aus? Kann Arrestin durch unterschiedliche Phosphorylierungszustände in Rezeptoren verschiedene Konformationen einnehmen? FRAP-Experimente zeigten, dass zum Beispiel β 2AR-Arrestin-3-Komplexe von geringer zeitlicher Stabilität sind. Es ist jedoch bisher nicht möglich zu analysieren, ob Arrestin im Moment des Abdiffundierens vom aktivierten Rezeptor in den inaktiven Zustand übergeht und dann erneut aktiviert wird oder aber einen präaktivierten Zwischenzustand einnimmt. Darüber hinaus könnte sich die funktionelle Charakterisierung von Arrestin-Rezeptorkomplexen in nachgeschalteten Signalwegen anschließen. Durch MS/MS-Experimente konnten neben Phosphorylierungsstellen im proximalen C-Terminus des PTHR auch Stellen im mittleren und distalen Teil identifiziert werden. Insbesondere S519 unterlag einer sehr robusten Phosphorylierung. Zur funktionellen Charakterisierung dieser Phosphorylierungsstelle bietet sich die Herstellung eines phosphospezifischen Antikörpers an.

Zusammenfassung

Die Phosphorylierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren spielt eine bedeutende Rolle für die Interaktion mit Arrestinen und die Rezeptordesensibilisierung. Es ist jedoch unklar, wie unterschiedliche Phosphorylierungsmuster die Interaktion von Arrestin mit Rezeptoren und den nachfolgende Transportmuster von Arrestin-Rezeptorkomplexen beeinflussen. In dieser Arbeit wurden zusätzliche Phosphorylierungsstellen in den C-Terminus des β 2-adrenergen Rezeptors eingefügt. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptormutante β 2AR SSS verstärkt phosphoryliert wurde und eine Erhöhung der Affinität zu Arrestin-3 aufwies. Darüber hinaus war das Transportmuster von Arrestin-3 mit diesem Rezeptor verändert. Die Rekrutierung von Arrestin-3 und die Stabilität von Arrestin-3-Rezeptorkomplexen wurden in Echtzeit mittels FRET und FRAP bestimmt. Es wurde gezeigt, dass Arrestin-3 schnell und fast vollständig vom β 2AR dissoziiert, während die Interaktion mit dem β 2AR SSS 2-4 fach verlängert war. Die Arrestin-Interaktion mit einer β 2V2-Rezeptorchimäre war innerhalb des betrachteten Zeitfensters kaum reversibel. Weitere Untersuchungen der Arrestin-3-Lokalisation ergaben, dass zusätzliche Phosphorylierungsstellen im β 2AR SSS zur Kolo-kalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen auf Endosomen führte. Der Wildtyp-Rezeptor hingegen interagiert nur transient mit Arrestin an der Plasmamembran. Der β 2AR SSS internalisierte stärker als der β 2AR, das Recycling für beide Rezeptoren verlief jedoch sehr ähnlich. Somit konnte diese Arbeit zeigen, dass die Interaktion zwischen Arrestin und Rezeptoren durch minimale Rezeptormodifikationen verstärkt werden kann und dass diese Veränderung ausreicht, um das Transportverhalten von Arrestin zu verändern.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten durch MS/MS-Experimente ligandenabhängige Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des humanen PTHR bestimmt werden. Dabei wurden drei bisher nicht identifizierte Stellen detektiert: T503, S519 und T547. Die Quantifizierung der agonistabhängigen PTHR-Phosphorylierung ergab, dass vor allem der Bereich zwischen S489 und S495 stark phosphoryliert wird oder für die Phosphorylierung nachfolgender Serin- und Threoninreste erforderlich ist. Bei der funktionellen Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen stellte sich hingegen heraus, dass insbesondere die Phosphorylierung zwischen S501-T506, im proximalen PTHR-C-Terminus für die Interaktion mit Arrestin-3 relevant ist. Dieser Bereich spielt für das Ausmaß der Gesamtphosphorylierung des Rezeptors nur eine untergeordnete Rolle.

Innerhalb dieses Clusters nehmen T503 und S504 eine wichtige Rolle für die robuste Interaktion mit Arrestin-3 ein. Obwohl die Mutation der Phosphorylierungsstellen im proximalen PTHR-C-Terminus zu Alanin die Interaktion mit Arrestin massiv beeinträchtigte, konnte mit keinem der in dieser Arbeit getesteten Rezeptorkonstrukte eine vollständige Inhibierung der Arrestin-3-Interaktion mit dem PTHR erzielt werden.

Dass die Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen nicht nur durch Modifikationen auf Rezeptorebene, sondern auch durch Modifikationen in Arrestin beeinflusst werden kann, wurde im dritten Teil dieser Arbeit gezeigt. Selbst konservierende Mutationen in phosphatsensitiven Elementen im N-Terminus von Arrestin-3 führten zur Reduktion der Affinität zum β 2AR, dem β 2AR SSS, dem β 2V2R und dem PTHR. Dadurch wurde auch die Kompartimentalisierung dieser Rezeptoren mit Arrestin beeinträchtigt. Die Kolo-kalisation von Arrestin-3K11,12R mit dem β 2V2R und dem β 2AR SSS auf Endosomen war zwar verringert, jedoch nicht ganz aufgehoben. Mit dem PTHR hingegen war kein endosomaler Kotransport mit Arrestin-3K11,12R zu beobachten. Daraus geht hervor, dass die Rolle der beiden Lysine für die Kompartimentalisierung von Arrestin-Rezeptorkomplexen nicht für alle Rezeptoren einheitlich ist.

Zusammenfassend zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass Arrestin unterschiedliche Phosphorylierungszustände im proximalen C-Terminus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren erkennen kann. Die zeitliche Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen wird durch die Anzahl und die Lokalisation von Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Rezeptoren bestimmt. Dies wirkt sich auch auf die zelluläre Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen aus: Je höher die zeitliche Stabilität eines Arrestin-Rezeptor-Komplexes ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese in intrazellulären Kompartimenten, wie Endosomen zu finden sind. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass Arrestin rezeptorspezifische und phosphorylierungsspezifische Komplexe bilden kann.

Summary

Agonist-induced phosphorylation of GPCRs is a significant prerequisite for the interaction with arrestins and receptor desensitization. Yet, it is unclear how different phosphorylation patterns impact on the interaction of arrestins with receptors and determine subsequent trafficking patterns of arrestin-receptor-complexes. In the present thesis this question was investigated at the β 2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. First, an additional serine cluster was inserted into the proximal part of the β 2-adrenoceptor's C-terminus. This receptor mutant, termed β 2AR SSS, showed enhanced agonist-dependent phosphorylation and an increase in the affinity for arrestin-3. In addition, the intracellular trafficking of arrestin-3 with this receptor was altered. The arrestin recruitment and the stability of arrestin-receptor-complexes were determined in real time by FRET and FRAP. It could be demonstrated that arrestin-3 dissociated quickly from the β 2AR whereas the interaction with the β 2AR SSS was two-to fourfold prolonged. The interaction of arrestin with a β 2V2 chimera was poorly reversible during the timescale of the experiment. Further experiments revealed that the additional phosphorylation sites in the β 2AR SSS led to colocalization of arrestin-receptor complexes on early endosomes in response to agonist. In contrast, the wild-type receptor interacted only transiently with arrestin at the plasma membrane. Furthermore the β 2AR SSS internalized more efficiently than the β 2AR whereas the recycling kinetics were very similar for both receptors. It was thus possible to show that the affinity between arrestins and receptors could be increased with minimal receptor modification. This was sufficient to alter the trafficking pattern of arrestin.

In the second part of this thesis the ligand-dependent phosphorylation sites of the human PTHR were determined by MS/MS. Ten phosphorylation sites could be identified of which three had not been described so far: T503, S519 and T547. The quantification of the ligand-dependent phosphorylation in PTHR mutants revealed that the first large serine cluster between S489-S495 in the C-terminal tail of the PTHR was massively phosphorylated or important for the phosphorylation of subsequent serine and threonine residues. Mutation of Ser and Thr residues between S501 and T506 showed that these residues play a crucial role for the interaction with arrestin-3. However, the extent of ligand-dependent phosphorylation within this second cluster was smaller than the phosphorylation within the first cluster. T503 und S504 within the second cluster were essential for the robust interaction with arrestin-3. Although the mutation of

phosphorylation sites in the proximal part of the C-terminus of the PTHR to alanine massively reduced the interaction with arrestin-3, in none of the receptor mutants was the interaction with arrestin abolished entirely

The stability of arrestin-receptor-complexes can not only be influenced on the level of receptors but can also be modified by modifications in arrestin. Two lysine to arginine mutations within phosphate-sensing elements in the N-terminus of arrestin-3 (K11,12R) were able to reduce the arrestin-3 affinity towards the β 2AR, the β 2AR SSS and the PTHR. Notably this impacted on the compartmentalization of these receptors with arrestin. Whereas the colocalization of Arrestin K11,12R on endosomes with the β 2AR SSS or the β 2V2R was reduced, no cotrafficking of ArrestinK11,12R could be observed with the PTHR. This suggests that, depending on the receptor subtype, phosphate-sensing elements within arrestin may be of varying significance.

In summary the experiments in this thesis show that arrestin is able to sense differential phosphorylation patterns in the proximal part of the C-terminus of GPCRs. The temporal stability of arrestin-receptor complexes is determined by the number and the localization of phosphorylation sites in the C-terminus of the GPCRs that were examined in this thesis. Importantly, this impacts on the cellular localization of arrestin-receptor complexes. The higher the temporal stability of an arrestin-receptor complex, the greater the probability will be that it can be found in endocytic compartments. These findings collectively suggest that arrestin is able to form receptor-specific and phosphorylation-specific complexes.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur eines GPCRs im inaktiven und aktiven Zustand

Abbildung 1.2: Aktive und inaktive Konformationen des $\beta 2AR$.

Abbildung 1.3: Ligandenbindung und Signaltransduktion am PTH1R.

Abbildung 1.4: 3-Element Interaktion

Abbildung 1.5: Energiezustände beim FRET

Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers.

Abbildung 2.1: Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP

Abbildung 2.2: Exemplarischer Fit der „on-rate“

Abbildung 2.3: Exemplarischer Fit der Dissoziationskinetik

Abbildung 2.4: Auswertung von FRAP-Experimenten

Abbildung 2.5: Veranschaulichung von Protein-Proteininteraktionsmessungen mittels FRAP

Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der verschiedenen $\beta 2AR$ -Varianten

Abbildung 3.2: Rezeptorexpression stabiler Zelllinien

Abbildung 3.3: Ablaufschema der MS/MS Probenaufbereitung

Abbildung 3.4: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids
AYGNGYSSNGNTSSpSpSGYHVEQEKENK aus dem $\beta 2AR$ SSS

Abbildung 3.5: ^{32}P -Inkorporation nach Isoprenalinbehandlung

Abbildung 3.6: Untersuchung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion mittels FRET

Abbildung 3.7: Echtzeitbestimmung der Arrestin-3-Dissoziationsrate von $\beta 2$ -adrenergen Rezeptoren

Abbildung 3.8: Arrestin-3-Interaktion $\beta 2$ -adrenerger Rezeptoren nach wiederholter Ligandenapplikation

Abbildung 3.9: Interaktion $\beta 2$ -adrenerger Rezeptoren mit visuellem Arrestin

Abbildung 3.10: Bestimmung der Arrestin-3 Affinität in Abwesenheit von GRK2

Abbildung 3.11: GRK2-Expression

Abbildung 3.12: $\beta 2AR$ -Phosphorylierung im inserierten SSS-Cluster

Abbildung 3.13: Die Anzahl der Phosphorylierungsstellen und das Ausmaß der ligandenabhängigen Arrestin-3-Rezeptorinteraktion

Abbildung 3.14: Arrestin-3-Interaktion am $\beta 2AR$ mit einem distalen SSS-Motiv

Abbildung 3.15: Bestimmung der Arrestin-3 Mobilität mittels Zweifarben-FRAP in Anwesenheit des Agonisten

- Abbildung 3.16: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 mit dem β 2AR, β 2AR SSS, und β 2V2R
- Abbildung 3.17: Kolokalisation von Arrestin-3 mit EEA1 nach β 2AR, β 2AR SSS, und β 2V2R Stimulation
- Abbildung 3.18: Lokalisation von Arrestin-3 und EEA1 am β 2AR 5S
- Abbildung 3.19: Agonist-induzierte Rezeptorinternalisierung und Recycling nach Entfernen des Agonists
- Abbildung 3.20: MAPK Aktivität vor und nach Stimulation des β 2AR oder β 2AR SSS
- Abbildung 3.21: Interaktion eines Arrestin-3-Ubiquitininfusionsproteins mit β 2-adrenergen Rezeptoren
- Abbildung 3.22: Expression des humanen HA-PTHr1 in HEK293-Zellen
- Abbildung 3.23: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)VGLGLPLSPR(L) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.24: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)SGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPR(V) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.25: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)SGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPR(V) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.26: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (R)SGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPR(V) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.27: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (K)PGTPALETLETPPAMAAPK(D) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.28: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (K)PGTPALETLETPPAMAAPK(D) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.29: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids (K)GWTSASTSGKPR(K) aus dem humanen PTHR
- Abbildung 3.30: Zusammenfassung der ligandenabhängigen Phosphorylierungsstellen im humanen PTHR.
- Abbildung 3.31: Sequenzen verwendeter PTHR-Konstrukte
- Abbildung 3.32: ^{32}P Inkorporation nach Stimulation mit hPTH 1-34
- Abbildung 3.33: Funktionelle Relevanz des PTHR-C-Terminus für die Interaktion mit Arrestin-3
- Abbildung 3.34: Ausmaß der Arrestin-3 Membrantranslokation mit verschiedenen PTHR-Mutanten
- Abbildung 3.35: Bestimmung des Einflusses der Mutation S501A-T506A im PTHR auf die Affinität von Arrestin-3 mittels FRAP
- Abbildung 3.36: Bestimmung des Einflusses der Mutation T503A und S504A im PTHR auf die Affinität zu Arrestin-3 mittels FRAP
- Abbildung 3.37: Fluoreszenz-Wiederkehr des HA-PTHr-YFP nach Photobleichen ohne vorherige Quervernetzung durch Antikörper
- Abbildung 3.38: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR oder am PTHR PD1

- Abbildung 3.39: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR PD2 oder am PTHR PD3
- Abbildung 3.40: Zelluläre Lokalisation von Arrestin-3 am PTHR PD3, S510A oder am PTHR PD5
- Abbildung 3.41: PTH-Rezeptorphosphorylierung nach Stimulation mit hPTH1-34 oder D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34
- Abbildung 3.42: Arrestin-3 Interaktion mit dem PTHR nach Stimulation mit hPTH1-34 oder D-Trp¹², Tyr³⁴ bPTH 7-34
- Abbildung 3.43: Vergleich der Dissoziationskinetiken zwischen Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R mit verschiedenen β 2-adrenergen Rezeptoren mittels FRET
- Abbildung 3.44: Bestimmung der Affinität von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R am PTHR mittels FRAP
- Abbildung 3.45: Bestimmung der Affinität von Arrestin-3 und Arrestin-3 K11,12R am β 2V2R mittels FRAP
- Abbildung 3.46: Intrazellulärer Transport von Arrestin-3 K11,12R am β 2AR SSS
- Abbildung 3.47: Einfluss der K11,12R Mutation in Arrestin-3 auf die endosomale Rekrutierung mit dem β 2V2R
- Abbildung 3.48: Rolle der K11,12R-Mutation bei der hPTH 1-34 vermittelten endosomalen Rekrutierung von Arrestin-3
- Abbildung 3.49: MS/MS Spektrum des Phosphopeptids 473-SWSRWTLALDFKR-485 des humanen PTHR.
- Abbildung 4.1: Sequenzvergleich von β -Faltblatt 1 im N-Terminus von Arrestin-1,-2, und -3.
- Abbildung 4.2: Lysine in β -Faltblatt I interagieren mit negativ geladenen Phosphaten eines Phosphopeptids.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 2.2:	Allgemeine Reagenzien
Tabelle 2.3:	Liste der in dieser Arbeit verwendeten cDNA Konstrukte
Tabelle 2.4:	Reagenzien für die eukaryote Zellkultur
Tabelle 2.5:	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer
Tabelle 3.1:	Zeitkonstanten aus FRET-Experimenten zwischen Arrestin 3 und verschiedenen β 2-Rezeptoren
Tabelle 3.2:	Zeitkonstanten und Anteil der mobilen Fraktionen aus FRAP-Experimenten
Tabelle 3.3:	Zusammenfassung der Phosphopeptide des humanen PTHR
Tabelle 3.4:	Zeitkonstanten und mobile Fraktionen aus FRAP-Experimenten am PTHR
Tabelle 3.5:	Zeitkonstanten und Ausmaß der Dissoziation von Arrestin-3 verglichen mit Arrestin 3 K11,12R an β 2-adrenergen Rezeptoren, ermittelt aus FRET-Experimenten
Tabelle 3.6:	Zeitkonstanten und mobile Fraktionen aus FRAP-Experimenten
Tabelle 3.7:	Alle proteinogenen Aminosäuren und ihre durchschnittlichen Massen.

Literaturverzeichnis

- Adler J, and Parmryd I (2007) Recent review on colocalization seem to misunderstand the Pearson correlation coefficient. *J Microsc* **227**:83; author reply 84–85.
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H, and Lefkowitz RJ (2004) Differential kinetic and spatial patterns of β -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* **279**:35518–35525.
- Andersson L, and Porath J (1986) Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. *Anal Biochem* **154**:250–254.
- Arrio-Dupont M, Foucault G, Vacher M, Douhou A, and Cribier S (1997) Mobility of creatine phosphokinase and beta-enolase in cultured muscle cells. *Biophys J* **73**:2667–2673.
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* **267**:17882–17890.
- Attwood P V., Besant PG, and Piggott MJ (2011) Focus on phosphoaspartate and phosphoglutamate. *Amino Acids* **40**:1035–1051.
- Aubry L, and Klein G (2013) Chapter Two - True Arrestins and Arrestin-Fold Proteins: A Structure-Based Appraisal. *Mol Biol Arrestins Volume* **118**:21–56.
- Audet M, and Bouvier M (2012) Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation. *Cell* **151**:14–23.
- Baillie GS, Adams DR, Bhari N, Houslay TM, Vadrevu S, Meng D, Li X, Dunlop A, Milligan G, Bolger GB, Klussmann E, and Houslay MD (2007) Mapping binding sites for the PDE4D5 cAMP-specific phosphodiesterase to the N- and C-domains of beta-arrestin using spot-immobilized peptide arrays. *Biochem J* **404**:71–80.
- Ballif BA, Carey GR, Sunyaev SR, and Gygi SP (2008) Large-scale identification and evolution indexing of tyrosine phosphorylation sites from murine brain. *J Proteome Res* **7**:311–318.
- Barakat B, Yu L, Lo C, Vu D, De Luca E, Cain JE, Martelotto LG, Martelotto LG, Dedhar S, Sadler AJ, Wang D, Watkins DN, and Hannigan GE (2013) Interaction of smoothened with integrin-linked kinase in primary cilia mediates Hedgehog signalling. *EMBO Rep* **14**:837–844.
- Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8879–8882.
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:2797–2801.
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1793**:933–940.

- Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, Sin YY, Laurent AC, Galés C, Baillie G, and Lezoualc'h F (2013) Specific interactions between Epac1, β -arrestin2 and PDE4D5 regulate β -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal* **25**:970–980.
- Bertrand L, Parent S, Caron M, Legault M, Joly E, Angers S, Bouvier M, Brown M, Houle B, and Ménard L (2002) The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J Recept Signal Transduct Res* **22**:533–541.
- Bhattacharya S, Hall SE, Li H, and Vaidehi N (2008) Ligand-stabilized conformational states of human beta(2) adrenergic receptor: insight into G-protein-coupled receptor activation. *Biophys J* **94**:2027–2042.
- Bian Y, Song C, Cheng K, Dong M, Wang F, Huang J, Sun D, Wang L, Ye M, and Zou H (2014) An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics* **96**:253–262.
- Biber J, Hernando N, Forster I, and Murer H (2009) Regulation of phosphate transport in proximal tubules. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **458**:39–52.
- Biemann K (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom* **16**:99–111.
- Blind E, Bambino T, Huang Z, Bliziotes M, and Nissenson R a (1996) Phosphorylation of the cytoplasmic tail of the PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* **11**:578–586.
- Blind E, Bambino T, and Nissenson RA (1995) Agonist-stimulated phosphorylation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* **136**:4271–4277.
- Bock A, Chirinda B, Krebs F, Messerer R, Bätz J, Muth M, Dallanoe C, Klingenthal D, Tränkle C, Hoffmann C, De Amici M, Holzgrabe U, Kostenis E, and Mohr K (2014) Dynamic ligand binding dictates partial agonism at a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* **10**:18–20.
- Bock A, Kostenis E, Tränkle C, Lohse MJ, and Mohr K (2014) Pilot the pulse: controlling the multiplicity of receptor dynamics. *Trends Pharmacol Sci* **35**:630–638.
- Bolte S, and Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* **224**:213–232.
- Bordoli MR, Yum J, Breitkopf SB, Thon JN, Italiano JE, Xiao J, Worby C, Wong S-K, Lin G, Edenius M, Keller TL, Asara JM, Dixon JE, Yeo C-Y, and Whitman M (2014) A Secreted Tyrosine Kinase Acts in the Extracellular Environment. *Cell* **158**:1033–1044.
- Boucrot E, Ferreira APA, Almeida-Souza L, Debard S, Vallis Y, Howard G, Bertot L, Sauvonnet N, and McMahon HT (2014) Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* **517**:460–465.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**:370–373.

- Breitman ML, Tsuda M, Usukura J, Kikuchi T, Zucconi A, Khoo W, and Shinohara T (1991) Expression of S-antigen in retina, pineal gland, lens, brain is directed by 5'-flanking sequences. *J Biol Chem* **266**:15505–15510.
- Bringham FR, Juppner H, Guo J, Urena P, Potts JT, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, and Segre G V (1993) Cloned, stably expressed parathyroid hormone (PTH)/ PTH-related peptide receptors activate multiple messenger signals and biological responses in LLC-PK1 kidney cells. *Endocrinology* **132**:2090–2098.
- Brugge JS, and Erikson RL (1977) Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* **269**:346–348.
- Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, and DuBois RN (2006) Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1492–1497.
- Buchowiecka AK (2014) Puzzling over protein cysteine phosphorylation – assessment of proteomic tools for S- phosphorylation profiling. *Analyst* **139**:4118–4123.
- Bünemann M, Frank M, and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:16077–16082.
- Burtey A, Schmid EM, Ford MGJ, Rappoport JZ, Scott MGH, Marullo S, Simon SM, McMahon HT, and Benmerah A (2007) The conserved isoleucine-valine-phenylalanine motif couples activation state and endocytic functions of beta-arrestins. *Traffic* **8**:914–931.
- Butcher AJ, Hudson BD, Shimpukade B, Alvarez-Curto E, Prihandoko R, Ulven T, Milligan G, and Tobin AB (2014) Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determines arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFA4. *J Biol Chem* **289**:18451–18465.
- Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, Mistry S, and Tobin AB (2011) Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem* **286**:11506–11518.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, and Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* **46** :121–136.
- Campbell ID, and Spitzfaden C (1994) Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure* **2**:333–337.
- Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A, and von Zastrow M (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the [beta]2-adrenergic receptor. *Nature* **401**:286–290.
- Carr R, Du Y, Quoyer J, Panettieri RA, Janz JM, Bouvier M, Kobilka BK, and Benovic JL (2014) Development and characterization of pepducins as Gs-biased allosteric agonists. *J Biol Chem* **289**:35668–84.
- Carter PH, Shimizu M, Luck MD, and Gardella TJ (1999) The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino- terminal portion of PTH-(1-34). *J Biol Chem* **274**:31955–31960.

- Chen CH, Paing MM, and Trejo J (2004) Termination of Protease-activated Receptor-1 Signaling by β -Arrestins Is Independent of Receptor Phosphorylation. *J Biol Chem* **279**:10020–10031.
- Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, and Crow MT (2000) The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* **87**:1172–1179.
- Chung CT, Niemela SL, and Miller RH (1989) One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2172–2175.
- Chung KY, Rasmussen SGF, Liu T, Li S, DeVree BT, Chae PS, Calinski D, Kobilka BK, Woods VL, and Sunahara RK (2011) Conformational changes in the G protein Gs induced by the β_2 adrenergic receptor. *Nature* **477**:611–615.
- Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT, and Lefkowitz RJ (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**:42509–42513.
- Clapham DE, and Neer EJ (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**:403–406.
- Coffa S, Breitman M, Spiller BW, and Gurevich VV (2011) A single mutation in arrestin-2 prevents ERK1/2 activation by reducing c-Raf1 binding. *Biochemistry* **50**:6951–6958.
- Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, and Bourne HR (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* **363**:274–276.
- Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, Christe M, Vatner SF, Seidman CE, and Seidman JG (1997) beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* **81**:1021–1026.
- Cupp ME, Nayak SK, Adem AS, and Thomsen WJ (2013) Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide domains contributing to activation of different PTH receptor-mediated signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **345**:404–418.
- Daaka Y, Luttrell LM, and Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**:88–91.
- Datta NS, and Abou-Samra AB (2009) PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* **21**:1245–1254.
- Davidson AJ, Ernst P, Wang Y, Dekens MPS, Kingsley PD, Palis J, Korsmeyer SJ, Daley GQ, and Zon LI (2003) cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes. *Nature* **425**:300–306.
- De Hoffmann E (1996) Tandem mass spectrometry: A primer. *J Mass Spectrom* **31**:129–137.
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, and Bunnett NW (2000) beta-Arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**:1267–1281.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, and Shenoy SK (2007) β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol* **69**:483–510.

- Digby GJ, Lober RM, Sethi PR, and Lambert NA (2006) Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17789–94.
- Divieti P, Geller a. I, Suliman G, Jüppner H, and Bringhurst FR (2005) Receptors specific for the carboxyl-terminal region of parathyroid hormone on bone-derived cells: Determinants of ligand binding and bioactivity. *Endocrinology* **146**:1863–1870.
- Dobolyi A, Dimitrov E, Palkovits M, and Usdin TB (2012) The neuroendocrine functions of the parathyroid hormone 2 receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**:121–131.
- Dorsch S, Klotz K-N, Engelhardt S, Lohse MJ, and Bünemann M (2009) Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* **6**:225–230.
- Downes GB, and Gautam N (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**:544–552.
- Edidin M, Zagyansky Y, and Lardner TJ (1976) Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* **191**:466–468.
- Elangovan M, Day RN, and Periasamy A (2002) Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *J Microsc* **205**:3–14.
- Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, and Vilardaga J (2011) Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol* **7**:278–284.
- Ferguson SS, Downey WE, Colapietro AM, Barak LS, Ménard L, and Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**:363–366.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* **437**:55–75.
- Frank M, Thümer L, Lohse MJ, and Bünemann M (2005) G Protein activation without subunit dissociation depends on a Galpha(i)-specific region. *J Biol Chem* **280**:24584–24590.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, and Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**:1256–1272.
- Gage RM, Kim KA, Cao TT, and von Zastrow M (2001) A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **276**:44712–44720.
- Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, and Keen JH (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* **18**:871–881.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Caron MG, and Lefkowitz RJ (2000) Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Pharmacol Sci* **21**:366–367.
- Galliera E, Jala VR, Trent JO, Bonecchi R, Signorelli P, Lefkowitz RJ, Mantovani A, Locati M, and Haribabu B (2004) β -arrestin-dependent constitutive internalization of the human chemokine decoy receptor D6. *J Biol Chem* **279**:25590–25597.

- Gardella TJ, and Vilardaga J-P (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. The Parathyroid Hormone Receptors--Family B G Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol Rev* **67**:310–337.
- Garland AM, Grady EF, Lovett M, Vigna SR, Frucht MM, Krause JE, and Bunnett NW (1996) Mechanisms of desensitization and resensitization of G protein-coupled neurokinin1 and neurokinin2 receptors. *Mol Pharmacol* **49**:438–446.
- Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, Eckhardt AE, Cowan CL, Spurney RF, Luttrell LM, and Lefkowitz RJ (2006) Distinct β -arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **281**:10856–10864.
- Gesty-Palmer D, Flannery P, Yuan L, Corsino L, Spurney R, Lefkowitz RJ, and Luttrell LM (2009) A beta-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Sci Transl Med* **1**:1ra1.
- Gesty-Palmer D, Yuan L, Martin B, Wood WH, Lee M-H, Janech MG, Tsoi LC, Zheng WJ, Luttrell LM, and Maudsley S (2013) β -Arrestin-Selective G Protein-Coupled Receptor Agonists Engender Unique Biological Efficacy in Vivo. *Mol Endocrinol* **27**:296–314.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**:90–113.
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**:615–649.
- Gimenez LE, Kook S, Vishnivetskiy SA, Ahmed MR, Gurevich E, and Gurevich VV (2012) Role of receptor-attached phosphates in binding of visual and non-visual arrestins to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **287**:9028–9040.
- Goldman ME, McKee RL, Caulfield MP, Reagan JE, Levy JJ, Gay CT, DeHaven PA, Rosenblatt M, and Chorev M (1988) A new highly potent parathyroid hormone antagonist: [D-Trp12,Tyr34]bPTH-(7--34)NH₂. *Endocrinology* **123**:2597–2599.
- Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich V V, Penn RB, Gagnon a W, Keen JH, and Benovic JL (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**:447–450.
- Granzin J, Wilden U, Choe HW, Labahn J, Krafft B, and Büldt G (1998) X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* **391**:918–921.
- Gurevich V V, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, and Benovic JL (1995) Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*.
- Gurevich VV, and Benovic JL (1992) Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J Biol Chem* **267**:21919–21923.
- Gurevich VV, and Benovic JL (1995) Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J Biol Chem* **270**:6010–6016.

- Gurevich VV, and Gurevich E (2013) Chapter Three - Structural Determinants of Arrestin Functions. *Mol Biol Arrestins* **Volume 118**:57–92.
- Gurevich VV, and Gurevich E (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **110**:465–502.
- Gurevich VV, Hanson SM, Song X, Vishnivetskiy SA, and Gurevich E (2011) The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells. *Prog Retin Eye Res* **30**:405–430.
- Ha T, Enderle T, Ogletree DF, Chemla DS, Selvin PR, and Weiss S (1996) Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6264–6268.
- Hall RA, Premont RT, Chow C-W, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S, and Lefkowitz RJ (1998) The [beta]2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* **392**:626–630.
- Hanson MA, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, Desale H, Clemons B, Cahalan SM, Schuerer SC, Sanna MG, Han GW, Kuhn P, Rosen H, and Stevens RC (2012) Crystal Structure of a Lipid G Protein-Coupled Receptor. *Science (80-)* **335**:851–855.
- Hanson SM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Kolobova EA, Hubbell WL, Klug CS, and Gurevich VV (2006) Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4900–4905.
- Hanson SM, and Gurevich V V. (2006) The differential engagement of arrestin surface charges by the various functional forms of the receptor. *J Biol Chem* **281**:3458–3462.
- Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse MJ, and Bünemann M (2006) Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* **281**:33345–51.
- Heldin CH (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**:213–223.
- Hirsch JA, Schubert C, Gurevich V V, and Sigler PB (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**:257–269.
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, and Klotz KN (2004) Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes - Characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**:151–159.
- Hollenstein K, de Graaf C, Bortolato A, Wang M-W, Marshall FH, and Stevens RC (2014) Insights into the structure of class B GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* **35**:12–22.
- Hollenstein K, Kean J, Bortolato A, Cheng RKY, Doré AS, Jazayeri A, Cooke RM, Weir M, and Marshall FH (2013) Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* **499**:438–443.
- Hornbeck P V., Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, and Sullivan M (2012) PhosphoSitePlus: A comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* **40**:261–270.

- Huang H-C, and Klein PS (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* **5**:234.
- Hustoft HK, Malerod H, Wilson SR, Reubsaet L, Lundanes E, and Greibrokk T (2010) A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics. *Integr Proteomics*, doi: 10.5772/2473.
- Innamorati G, Sadeghi HM, Tran NT, and Birnbaumer M (1998) A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2222–2226.
- Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SGF, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B, and von Zastrow M (2013) Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* **495**:534–538.
- Jala VR, Shao WH, and Haribabu B (2005) Phosphorylation-independent beta-arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors. *J Biol Chem* **280**:4880–4887.
- Johnson LN, and O'Reilly M (1996) Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* **6**:762–769.
- Johnson M (2001) Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatr Respir Rev* **2**:57–62.
- Kang DS, Kern RC, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Williams JC, and Benovic JL (2009) Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J Biol Chem* **284**:29860–29872.
- Karoor V, Wang L, Wang HY, and Malbon CC (1998) Insulin stimulates sequestration of β -adrenergic receptors and enhanced association of β -adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *J Biol Chem* **273**:33035–33041.
- Katenkamp U (1980) Fluorescence Studies on Biological Membranes. *Bioelectrochemistry Bioenerg* **24**:67–69.
- Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, and Lippincott-Schwartz J (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol* **165**:735–746.
- Kim G-H, and Han J-K (2007) Essential role for beta-arrestin 2 in the regulation of Xenopus convergent extension movements. *EMBO J* **26**:2513–2526.
- Kim YM, Barak LS, Caron MG, and Benovic JL (2002) Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* **277**:16837–16846.
- Kim Y-M, and Benovic JL (2002) Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* **277**:30760–30768.
- Klenk C, Schulz S, Calebiro D, and Lohse MJ (2010) Agonist-regulated cleavage of the extracellular domain of parathyroid hormone receptor type 1. *J Biol Chem* **285**:8665–8674.
- Kostenis E, Conklin BR, and Wess J (1997) Molecular basis of receptor/G protein coupling selectivity studied by coexpression of wild type and mutant m2 muscarinic receptors with mutant $G\alpha(q)$ subunits. *Biochemistry* **36**:1487–1495.

- Kovanen PT, Faust JR, Brown MS, and Goldstein JL (1979) Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells. *Endocrinology* **104**:599–609.
- Kovoor A, Celver J, Abdryashitov RI, Chavkin C, and Gurevich V V (1999) Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* **274**:6831–6834.
- Krasel C, Bünemann M, Lorenz K, and Lohse MJ (2005) Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem* **280**:9528–35.
- Krasel C, Zabel U, Lorenz K, Reiner S, Al-Sabah S, and Lohse MJ (2008) Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization. *J Biol Chem* **283**:31840–8.
- Lagerström MC, and Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**:339–357.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, and Brown TG (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* **214**:597–598.
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, and Barak LS (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3712–3717.
- Lee CH, Katz a, and Simon MI (1995) Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor. *Mol Pharmacol* **47**:218–223.
- Liao DF, Monia B, Dean N, and Berk BC (1997) Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272**:6146–6150.
- Lidke DS, Nagy P, Barisas BG, Heintzmann R, Post JN, Lidke KA, Clayton AHA, Arndt-Jovin DJ, and Jovin TM (2003) Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET). *Biochem Soc Trans* **31**:1020–1027.
- Lin F-T, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, and Lefkowitz RJ (2002) Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**:10692–10699.
- Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher J a, and Lefkowitz RJ (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem* **272**:31051–31057.
- Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, and Lefkowitz RJ (1999) Feedback regulation of β -arrestin1 function by extracellular signal- regulated kinases. *J Biol Chem* **274**:15971–15974.
- Liu X, Zhao X, Zeng X, Bossers K, Swaab DF, Zhao J, and Pei G (2012) β -Arrestin1 regulates γ -secretase complex assembly and modulates amyloid- β pathology. *Cell Res* **23**:351–365.
- Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1179**:171–188.

- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins: Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β_2 -adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* **267**:8558–8564.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**:1547–1550.
- López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Martínez-Bartolomé S, García-Ruiz P, and Vázquez J (2006) Quantitative proteomics using $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* **6 Suppl 1**:S4–S11.
- Loroch S, Dickhut C, Zahedi RP, and Sickmann A (2013) Phosphoproteomics-More than meets the eye. *Electrophoresis* **34**:1483–1492.
- Luck MD, Carter PH, and Gardella TJ (1999) The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol Endocrinol* **13**:670–680.
- Lundgren K, Tobin NP, Lehn S, Stål O, Rydén L, Jirstrom K, and Landberg G (2011) Stromal expression of β -arrestin-1 predicts clinical outcome and tamoxifen response in breast cancer. *J Mol Diagn* **13**:340–351.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**:655–661.
- Luttrell LM, and Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**:455–465.
- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rümenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, and Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**:11134–11139.
- Ma P, and Zimmel R (2002) Value of novelty? *Nat Rev Drug Discov* **1**:571–572.
- Maggio R, Vogel Z, and Wess J (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:3103–3107.
- Mahon MJ, Donowitz M, Yun CC, and Segre G V (2002) $\text{Na}(+)/\text{H}(+)$ exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature* **417**:858–861.
- Malecz N, Bambino T, Bencsik M, and Nissenson RA (1998) Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol* **12**:1846–1856.
- Malik S, DeRubio RG, Trembley M, Irannejad R, Wedegaertner PB, and Smrcka A V (2015) G protein subunits regulate cardiomyocyte hypertrophy through a perinuclear Golgi phosphatidylinositol 4-phosphate hydrolysis pathway. *Mol Biol Cell* **26**:1188–1198.
- Manglik A, and Kobilka B (2014) The role of protein dynamics in GPCR function: Insights from the beta-2AR and rhodopsin. *Curr Opin Cell Biol* **27**:136–143.

- Mangmool S, Haga T, Kobayashi H, Kim K-M, Nakata H, Nishida M, and Kurose H (2006) Clathrin required for phosphorylation and internalization of beta2-adrenergic receptor by G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). *J Biol Chem* **281**:31940–31949.
- Marion S, Fralish GB, Laporte S, Caron MG, and Barak LS (2007) N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the β -arrestins. *J Biol Chem* **282**:18937–18944.
- Martensen TM (1984) Chemical properties, isolation, and analysis of O-phosphates in proteins. *Methods Enzymol* **107**:3–23.
- Maudsley S, Martin B, Gesty-Palmer D, Cheung H, Johnson C, Patel S, Becker KG, Wood WH, Zhang Y, Lehmann E, and Luttrell LM (2015) Delineation of a conserved arrestin-biased signaling repertoire in vivo. *Mol Pharmacol* **87**:706–717.
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, and Lefkowitz RJ (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**:1574–1577.
- Meisenhelder J, Hunter T, and van der Geer P (2001) Phosphopeptide mapping and identification of phosphorylation sites. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 13**:Unit13.9.
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, and Bouvier M (2002) Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**:44925–44931.
- Milano SK, Pace HC, Kim YM, Brenner C, and Benovic JL (2002) Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* **41**:3321–3328.
- Milligan G, and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl** :S46–S55.
- Mishra A, Eathiraj S, Corvera S, and Lambright DG (2010) Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10866–10871.
- Misiano P, Scott BB, Scheideler MA, and Garnier M (2003) PTH2 receptor-mediated inhibitory effect of parathyroid hormone and TIP39 on cell proliferation. *Eur J Pharmacol* **468**:159–166.
- Mitchell FM, Russell M, and Johnson GL (1995) Differential calcium dependence in the activation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by muscarinic acetylcholine receptors in rat 1a cells. *Biochem J* **309** (Pt 2):381–384.
- Moore CAC, Milano SK, and Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**:451–482.
- Moreira IS (2014) Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1840**:16–33.
- Moussa O, Ashton AW, Fraig M, Garrett-Mayer E, Ghoneim MA, Halushka P V., and Watson DK (2008) Novel role of thromboxane receptors β isoform in bladder cancer pathogenesis. *Cancer Res* **68**:4097–4104.

- Mukherjee S, Gurevich V V., Preninger A, Hamm HE, Bader MF, Fazleabas AT, Birnbaumer L, and Hunzicker-Dunn M (2002) Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin2. *J Biol Chem* **277**:17916–17927.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**:263–273.
- Murray JI, Spivey AC, and Woscholski R (2013) Alternative synthetic tools to phospho-specific antibodies for phosphoproteome analysis: Progress and prospects. *J Chem Biol* **6**:175–184.
- Nagy P, Vereb G, Post J, Friedländer E, and Szölloősi J (2005) *Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling* (Damjanovich S ed), Springer Berlin Heidelberg.
- Nelson CD, Kovacs JJ, Nobles KN, Whalen EJ, and Lefkowitz RJ (2008) β -arrestin scaffolding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase $\text{I}\alpha$ promotes agonist-stimulated sequestration of the $\beta 2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **283**:21093–21101.
- Nelson CD, Perry SJ, Regier DS, Prescott SM, Topham MK, and Lefkowitz RJ (2007) Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science* **315**:663–666.
- Ni Y, Zhao X, Bao G, Zou L, Teng L, Wang Z, Song M, Xiong J, Bai Y, and Pei G (2006) Activation of beta2-adrenergic receptor stimulates gamma-secretase activity and accelerates amyloid plaque formation. *Nat Med* **12**:1390–1396.
- Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang T-Y, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, and Lefkowitz RJ (2011) Distinct Phosphorylation Sites on the beta2-Adrenergic Receptor Establish a Barcode That Encodes Differential Functions of beta-Arrestin. *Sci Signal* **4**:ra51.
- Noma T, Lemaire A, Naga Prasad S V., Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ, and Rockman HA (2007) β -Arrestin-mediated $\beta 1$ -adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* **117**:2445–2448.
- Nygaard R, Zou Y, Dror RO, Mildorf TJ, Arlow DH, Manglik A, Pan AC, Liu CW, Fung JJ, Bokoch MP, Thian FS, Kobilka TS, Shaw DE, Mueller L, Prosser RS, and Kobilka BK (2013) The dynamic process of $\beta 2$ -adrenergic receptor activation. *Cell* **152**:532–542.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, and Caron MG (1999) Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* **274**:32248–32257.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, and Caron MG (2001) Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor- β -Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis. *J Biol Chem* **276**:19452–19460.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, and Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**:17201–17210.
- Olsen J V., Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, and Mann M (2006) Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* **127**:635–648.

- Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, and Stamler JS (2008) S-Nitrosylation of β -Arrestin Regulates β -Adrenergic Receptor Trafficking. *Mol Cell* **31**:395–405.
- Pal K, Mathur M, Kumar P, and DeFea K (2013) Divergent beta-arrestin-dependent signaling events are dependent upon sequences within G-protein-coupled receptor C termini. *J Biol Chem* **288**:3265–3274.
- Perera RK, and Nikolaev VO (2013) Compartmentation of cAMP signalling in cardiomyocytes in health and disease. *Acta Physiol* **207**:650–662.
- Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, and Lefkowitz RJ (2002) Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* **298**:834–836.
- Philipp M, Evron T, and Caron MG (2013) Chapter Nine - The Role of Arrestins in Development. *Mol Biol Arrestins Volume* **118**:225–242.
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**:503–533.
- Pioszak AA, and Xu HE (2008) Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5034–5039.
- Pippig S, Andexinger S, Daniel K, Puzicha M, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Lohse MJ (1993) Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **268**:3201–3208.
- Pitcher JA, Freedman NJ, and Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**:653–92.
- Potthoff SA, Janus A, Hoch H, Frahnert M, Tossios P, Reber D, Giessing M, Klein HM, Schwertfeger E, Quack I, Rump LC, and Vonend O (2011) PTH-receptors regulate norepinephrine release in human heart and kidney. *Regul Pept* **171**:35–42, Elsevier B.V.
- Potts JT, Tregear GW, Keutmann HT, Niall HD, Sauer R, Deftos LJ, Dawson BF, Hogan ML, and Aurbach GD (1971) Synthesis of a biologically active N-terminal tetratriacontapeptide of parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:63–67.
- Qian F, Leung A, and Abou-Samra A (1998) Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochemistry* **37**:6240–6246.
- Raina H, Zacharia J, Li M, and Wier WG (2009) Activation by Ca²⁺/calmodulin of an exogenous myosin light chain kinase in mouse arteries. *J Physiol* **587**:2599–2612.
- Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, and Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature* **469**:175–180.
- Rasmussen SGF, Choi H-J, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VRP, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GFX, Weis WI, and Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**:383–387.

- Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, and Kobilka BK (2011) Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* **477**:549–555.
- Reiner S, Ambrosio M, Hoffmann C, and Lohse MJ (2010) Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **285**:36188–36198.
- Reiner S, Ziegler N, Leon C, Lorenz K, Hayn K Von, Gachet C, Lohse MJ, and Hoffmann C (2009) β -Arrestin-2 Interaction and Internalization of the Human P2Y₁ Receptor Are Dependent on C-Terminal Phosphorylation Sites. *Mol Pharmacol* **76**:1162–1171.
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK, and Lefkowitz RJ (2012) Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**:179–197.
- Reits EA, and Neefjes JJ (2001) From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* **3**:E145–E147.
- Ren X-R, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, and Lefkowitz RJ (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1448–1453.
- Rey A, Manen D, Rizzoli R, Caverzasio J, and Ferrari SL (2006) Proline-rich motifs in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor C terminus mediate scaffolding of c-Src with β -arrestin2 for ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **281**:38181–38188.
- Richardson MD, Balias AM, Yamaguchi K, Freilich ER, Barak LS, and Kwatra MM (2003) Human substance P receptor lacking the C-terminal domain remains competent to desensitize and internalize. *J Neurochem* **84**:854–863.
- Ritter SL, and Hall R a (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:819–830.
- Rogers S, Wells R, and Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**:364–368.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi H-J, Yao X-J, Weis WI, Stevens RC, and Kobilka BK (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**:1266–1273.
- Rosenqvist H, Ye J, and Jensen O (2011) Analytical Strategies in Mass Spectrometry-Based Phosphoproteomics. *Gel-Free Proteomics SE - 13* **753**:183–213.
- Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:6201–6204.
- Schmid EM, Ford MGJ, Burtey A, Praefcke GJK, Peak-Chew SY, Mills IG, Benmerah A, and McMahon HT (2006) Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* **4**:1532–1548.
- Sebastian EM, Suva LJ, and Friedman PA (2015) Differential effects of intermittent PTH(1–34) and PTH(7–34) on bone microarchitecture and aortic calcification in experimental renal failure. *Bone* **43**:1022–1030.

- Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, and Clark RB (2000) Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol Pharmacol* **58**:1162–1173.
- Shenoy SK, Barak LS, Xiao K, Ahn S, Berthouze M, Shukla AK, Luttrell LM, and Lefkowitz RJ (2007) Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem* **282**:29549–29562.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz D a., Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, and Lefkowitz RJ (2006) β -arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* **281**:1261–1273.
- Shenoy SK, and Lefkowitz RJ (2005) Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem* **280**:15315–15324.
- Shenoy SK, and Lefkowitz RJ (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* **278**:14498–14506.
- Shenoy SK, and Lefkowitz RJ (2011) β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* **32**:521–533.
- Shimada M, Mahon MJ, Greer P a, and Segre G V (2005) The receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide is hydrolyzed and its signaling properties are altered by directly binding the calpain small subunit. *Endocrinology* **146**:2336–2344.
- Shrestha D, Jenei A, Nagy P, Vereb G, and Szöllösi J (2015) Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *Int J Mol Sci* **16**:6718–6756.
- Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng W-C, Staus DP, Hilger D, Uysal S, Huang L-Y, Paduch M, Tripathi-Shukla P, Koide A, Koide S, Weis WI, Kossiakoff AA, Kobilka BK, and Lefkowitz RJ (2013) Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* **497**:137–141.
- Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang L, Tripathi-Shukla P, Qian J, Li S, Blanc A, Oleskie AN, Dosey AM, Su M, Liang C, Gu L, Shan J, Chen X, Hanna R, Choi M, Yao XJ, Klink BU, Kahsai AW, Sidhu SS, Koide S, Penczek PA, Kossiakoff AA, Woods Jr VL, Kobilka BK, Skiniotis G, and Lefkowitz RJ (2014) Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* **512**:218–222.
- Sickmann A, and Meyer HE (2001) Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* **49**:200–206.
- Simon MI, Strathmann MP, and Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**:802–808.
- Singh ATK, Gilchrist A, Voyno-Yasenetskaya T, Radeff-Huang JM, and Stern PH (2005) G alpha12/G alpha13 subunits of heterotrimeric G proteins mediate parathyroid hormone activation of phospholipase D in UMR-106 osteoblastic cells. *Endocrinology* **146**:2171–2175.
- Siu FY, He M, de Graaf C, Han GW, Yang D, Zhang Z, Zhou C, Xu Q, Wacker D, Joseph JS, Liu W, Lau J, Cherezov V, Katritch V, Wang M-W, and Stevens RC (2013) Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **499**:444–449.

- Slessareva JE, Routt SM, Temple B, Bankaitis V a., and Dohlman HG (2006) Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34 by a G Protein α Subunit at the Endosome. *Cell* **126**:191–203.
- Smith WC, Milam AH, Dugger D, Arendt A, Hargrave P a, and Palczewski K (1994) A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *J Biol Chem* **269**:15407–15410.
- Sobolesky PM, and Moussa O (2013) Chapter Fifteen - The Role of β -Arrestins in Cancer, in *The Molecular Biology of Arrestins*, Progress in Molecular Biology and Translational Science 118:395-411.
- Sommer ME, Elgeti M, Hildebrand PW, Szczepek M, Hofmann KP, and Scheerer P (2015) Chapter Twenty-Six - Structure-Based Biophysical Analysis of the Interaction of Rhodopsin with G Protein and Arrestin. *Membr Proteins—Production Funct Charact* **Volume 556**:563–608.
- Song X, Coffa S, Fu H, and Gurevich V V. (2009) How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J Biol Chem* **284**:685–695.
- Stenmark H, Aasland R, Toh BH, and D'Arrigo A (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc- binding FYVE finger. *J Biol Chem* **271**:24048–24054.
- Strader CD, Fong TM, Graziano MP, and Tota MR (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* **9**:745–754.
- Sun X, Zhang Y, Wang J, Wei L, Li H, Hanley G, Zhao M, Li Y, and Yin D (2010) Beta-arrestin 2 modulates resveratrol-induced apoptosis and regulation of Akt/GSK3 β pathways. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1800**:912–918.
- Szczepek M, Beyrière F, Hofmann KP, Elgeti M, Kazmin R, Rose A, Bartl FJ, Stetten D Von, Heck M, Sommer ME, Hildebrand PW, and Scheerer P (2014) Crystal structure of a common GPCR binding interface for G protein and arrestin. *Nat Commun* **5**:1–20.
- Tawfeek HAW, and Abou-Samra AB (2008) Negative regulation of parathyroid hormone (PTH)-activated phospholipase C by PTH/PTH-related peptide receptor phosphorylation and protein kinase A. *Endocrinology* **149**:4016–4023.
- Tawfeek HAW, Qian F, and Abou-Samra AB (2002) Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling. *Mol Endocrinol* **16**:1–13.
- Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, and Exton JH (1991) Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* **350**:516–518.
- Tazawa H, Takahashi S, and Zilliacus J (2003) Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1620**:32–38.
- Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**:1504–1508.
- Thathiah A, Horré K, Snellinx A, Vandeweyer E, Huang Y, Ciesielska M, De Kloe G, Munck S, and De Strooper B (2012) β -arrestin 2 regulates A β generation and γ -secretase activity in Alzheimer's disease. *Nat Med* **19**:43–49.

- Thingholm TE, Jensen ON, and Larsen MR (2009) Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* **9**:1451–1468.
- Tobin AB (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol* **153 Suppl** :S167–S176.
- Tobin AB, Butcher AJ, and Kong KC (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* **29**:413–420.
- Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Luttrell LM (2003) The stability of the G protein-coupled receptor- β -arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* **278**:6258–6267.
- Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, Laleman W, Klein S, Granzow M, Nevens F, Zaagsma J, Heller J, and Sauerbruch T (2009) Role of beta3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology* **50**:1924–1935.
- Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B, and von Zastrow M (2005) Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry* **44**:6133–6143.
- Ubersax JA, and Ferrell Jr JE (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:530–541.
- Urano D, and Jones AM (2014) Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **65**:365–384.
- Usdin TB, Modi W, and Bonner TI (1996) Assignment of the human PTH2 receptor gene (PTHR2) to chromosome 2q33 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **37**:140–141.
- Van der Lee MMC, Verkaar F, Wat JWY, van Offenbeek J, Timmerman M, Voorneveld L, van Lith LHCJ, and Zaman GJR (2013) β -Arrestin-biased signaling of PTH analogs of the type 1 parathyroid hormone receptor. *Cell Signal* **25**:527–538.
- Vaughan DJ, Millman EE, Godines V, Friedman J, Tran TM, Dai W, Knoll BJ, Clark RB, and Moore RH (2006) Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation. *J Biol Chem* **281**:7684–7692.
- Vilardaga JP, Frank M, Krasel C, Dees C, Nissenson RA, and Lohse MJ (2001) Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein. *J Biol Chem* **276**:33435–33443.
- Vilardaga J-P, Krasel C, Chauvin S, Bambino T, Lohse MJ, and Nissenson RA (2002) Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association. *J Biol Chem* **277**:8121–8129.
- Violin JD, Ren X-R, and Lefkowitz RJ (2006) G-protein-coupled receptor kinase specificity for beta-arrestin recruitment to the beta2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **281**:20577–20588.

- Vishnivetskiy SA, Francis D, Van Eps N, Kim M, Hanson SM, Klug CS, Hubbell WL, and Gurevich VV (2010) The role of arrestin alpha-helix I in receptor binding. *J Mol Biol* **395**:42–54.
- Vishnivetskiy SA, Hosey MM, Benovic JL, and Gurevich VV (2004) Mapping the arrestin-receptor interface: Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins. *J Biol Chem* **279**:1262–1268.
- Vishnivetskiy SA, Raman D, Wei J, Kennedy MJ, Hurley JB, and Gurevich VV (2007) Regulation of arrestin binding by rhodopsin phosphorylation level. *J Biol Chem* **282**:32075–83.
- Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, and Gurevich VV (2000) An additional phosphate-binding element in arrestin molecule: Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem* **275**:41049–41057.
- Vrecl M, Jorgensen R, Pogacnik A, and Heding A (2004) Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J Biomol Screen* **9**:322–333.
- Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SGF, Huang B, Zare RN, Kobilka B, and Sunahara RK (2007) A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:7682–7687.
- Winstel R, Freund S, Krasel C, Hoppe E, and Lohse MJ (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2105–2109.
- Wolfe MS (2013) Alzheimer's gamma-secretase under arrestin. *Nat Med* **19**:22–24.
- Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger DA, and White FM (2007) Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5860–5865.
- Woo AYH, Jozwiak K, Toll L, Tanga MJ, Kozocas J a., Jimenez L, Huang Y, Song Y, Plazinska A, Pajak K, Paul RK, Bernier M, Wainer IW, and Xiao RP (2014) Tyrosine 308 is necessary for ligand-directed Gs protein-biased signaling of β 2-adrenoceptor. *J Biol Chem* **289**:19351–19363.
- Worthington J, Cutillas PR, and Timms JF (2011) IMAC/TiO₂ enrich for peptide modifications other than phosphorylation: Implications for chromatographic choice and database searching in phosphoproteomics. *Proteomics* **11**:4583–4587.
- Wu G, Krupnick JG, Benovic JL, and Lanier SM (1997) Interaction of Arrestins with intracellular domains of muscarinic and alpha 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **272**:17836–17842.
- Wu N, Hanson SM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Thibonnier M, Klug CS, Shoham M, and Gurevich V V. (2006) Arrestin Binding to Calmodulin: A Direct Interaction Between Two Ubiquitous Signaling Proteins. *J Mol Biol* **364**:955–963.
- Wyatt D, Malik R, Vesecky AC, and Marchese A (2011) Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J Biol Chem* **286**:3884–3893.
- Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR, and Lefkowitz RJ (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:12011–12016.

- Zhang G, and Neubert TA (2011) Comparison of three quantitative phosphoproteomic strategies to study receptor tyrosine kinase signaling. *J Proteome Res* **10**:5454–5462.
- Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte S a, Caron MG, and Ferguson SSG (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* **274**:10999–11006.
- Zidar DA, Violin JD, Whalen EJ, and Lefkowitz RJ (2009) Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9649–9654.
- Zindel D, Butcher AJ, Al-Sabah S, Lanzerstofer P, Weghuber J, Tobin AB, Bünemann M, and Krasel C (2015) Engineered hyperphosphorylation of the β 2-adrenoceptor prolongs arrestin-3 binding and induces arrestin internalization. *Mol Pharmacol* **87**:349–362.

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Zindel D, Butcher AJ, Al-Sabah S, Lanzerstofer P, Weghuber J, Tobin AB, Bünemann M, and Krasel C (2015) Engineered hyperphosphorylation of the β 2-adrenoceptor prolongs arrestin-3 binding and induces arrestin internalization. *Mol Pharmacol* 87:349–362.

Konferenzbeiträge und Posterpräsentationen

Gordon Research Conference on Molecular Pharmacology Ventura 2015, Poster Presentation: “Engineered Hyperphosphorylation of the β 2-Adrenoceptor Prolongs Arrestin-3 Binding and Induces Arrestin Internalization”

5th BPS Focused Meeting on Cell Signalling Leicester 2014, Poster Presentation: “In vitro knock-in of phosphorylation sites alters arrestin-3 dynamics and trafficking properties of the beta2-adrenoceptor”

DGPT Hannover 2014, Poster Presentation: “Identification of residues of parathyroid hormone receptors undergoing agonist- induced phosphorylation” *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol* (2014) 3 (Suppl 1):S1–S113 DOI 10.1007/s00210-014-0960-87x

DGPT Halle 2013, Poster Presentations: D. Zindel, M. Bünemann, C. Krasel: Arrestin3 affinity to β 2AR is independent from ubiquitination but determined by the number of phosphorylation sites. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 386 (2013): S96 (Suppl. 1)

C. Krasel, O. Prokopets, D. Zindel, M. Bünemann: Real-time measurements of the interaction of GRK2 with the α 2A-adrenergic receptor and G $\beta\gamma$. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 386 (2013): S44 (Suppl. 1)

GPCR-Symposium of the Rudolf Virchow Center Würzburg October 2012, Poster Presentation: “Arrestin affinity to GPCRs is determined by the number of phosphorylation sites”

4th BPS Focused Meeting on Cell Signalling Leicester 2012, Poster Presentation: “Ubiquitinylation of arrestin has no effect on its affinity to G-protein-coupled receptors”

Grants

Recipient of a DAAD PROMOS Travel Grant May 2013

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Diana Zindel, geb. Hupfeld
Geburtsdatum:	09.05.1987
Geburtsort:	Eschwege
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	Deutsch

Schulbildung:

Juni 2006	Abitur am Oberstufengymnasium in Eschwege
-----------	---

Studium:

Oktober 2006-Oktober 2010	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg
---------------------------	--

Praktisches Jahr

November 2010-April 2011	Pharmaziepraktikantin in der Apotheke am Ludwigsplatz in Gießen
Mai 2011-November 2011	Pharmaziepraktikantin am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmazie unter der Leitung von Prof. Moritz Bünemann und Dr. Cornelius Krasel
Dezember 2011	Approbation als Apothekerin

Promotionsstudium

Januar 2012-Juni 2015	Dissertation am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmazie unter der Leitung von Dr. Cornelius Krasel und Prof. Moritz Bünemann
September 2013-Dezember 2013	DAAD Stipendium zur Untersuchung spezifischer Phosphorylierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren am Medical Research Council in Leicester unter der Leitung von Dr. Adrian Butcher und Prof. Andrew Tobin
Juni 2014	TIRF-Mikroskopie im Labor von Prof. Julian Weghuber

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Die zeitliche Stabilität und zelluläre Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen wird durch die Rezeptorphosphorylierung determiniert“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Datum, Ort

Unterschrift

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2012 - Juni 2015 unter der Leitung von Dr. Cornelius Krasel und Prof. Dr. Moritz Bünemann am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg durchgeführt.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Cornelius Krasel und Prof. Dr. Moritz Bünemann für die Bereitstellung und engagierte Betreuung meines Dissertationsthemas. Die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die fachlich und methodisch fundierten Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich für die Freiheit auch Fragestellungen bearbeiten zu dürfen, die etwas von der ursprünglichen Planung abwichen. Manch kritische Rückfrage und die Unterstützung beim Einschlagen neuer Richtungen haben meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten gefördert. Durch das in die Wege leiten von Forschungsaufenthalten in Großbritannien und Österreich durfte ich neue Methoden erlernen, welche diese Arbeit voranbrachten. Darüber hinaus bedanke ich mich für die großartige Möglichkeit Teile dieser Arbeit auf nationalen und internationalen Tagungen präsentieren zu dürfen. Dr. Cornelius Krasel danke ich herzlich für die exzellente und geduldige Einarbeitung in die Molekularbiologie und die Arbeit im Isotopenlabor. Die Möglichkeit sich stets über Ergebnisse und die Versuchsplanung austauschen zu können, hat diese Arbeit bereichert.

Bei Prof. Dr. Andrew Tobin und Dr. Adrian Butcher bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme im Labor der MRC Toxicology Unit in Leicester in Großbritannien. Die ausgezeichnete methodische Betreuung, zahlreiche spannende Diskussionen und der wunderbare englische Grundoptimismus haben nach anfänglichen Rückschlägen mein Durchhaltevermögen und meine Freude am Experimentieren gefördert. Die Möglichkeit auch nach der Zeit meines Aufenthalts Proben zur MS/MS-Analyse schicken zu dürfen, mündete in vielen neuen Experimenten und spannenden Fragestellungen.

Prof. Dr. Julian Weghuber und Dr. Peter Lanzerstorfer danke ich für die gute Zusammenarbeit an verschiedenen Projekten und die schöne Zeit in Wels, in Oberösterreich.

Dr. Christian Wrocklage und Prof. Gerhart Schratt danke ich für die Möglichkeit im Isotopenlabor und am Konfokalmikroskop arbeiten zu dürfen.

Bei Dr. Valerie Wolters und Dr. Markus Milde bedanke ich mich herzlich für die Einarbeitung ins „FRET-Geschäft“. Viele Tipps zur Überwindung der Eigenheiten der Nikon-Software haben den Arbeitsalltag erleichtert. Zudem kann ich dank eurer Kletterbegeisterung nun weitestgehend angstfrei auf Klettersteigen herumkraxeln.

Sandra Engel danke ich für viele lustige Gespräche und die hervorragende Hilfe bei den finalen FRET-Messungen dieser Arbeit. Das experimentelle Design und die Diskussionen nach der Datenauswertung haben mir sehr viel Freude gemacht.

Emma Esser danke ich für alle Hilfe in organisatorischen Dingen.

Sandra Engel und Anna-Lena Krett danke ich sehr für die Grundorganisation eines reibungslosen Laboralltags.

Anna-Lena Krett danke ich für ihre Aufmerksamkeit und ihre Herzlichkeit, welche die Arbeitstage so schön machten. Ebenso bedanke ich mich bei ihr, Dr. Eva-Lisa Bodmann, Alexandra Birk und Valerie Wolters für unsere vielen angeregten Gespräche, mit oder ohne schwarzen Tee, über Gott und die Welt sowie wissenschaftliche Inhalte. Einen besonderen Platz in meinem Gedächtnis nehmen unsere „Freitagsgespräche“ ein, die wir vor allem zu Beginn der Promotionszeit auch manchmal während der Woche oder gar schon an Montagen führten. Unsere gemeinsamen Fahrten zu Annas Polterabend, in den Klettergarten, zu Tagungen und anlässlich Markus' oder Valeries Promotion, ach und so vieles andere werden mir in unvergesslicher Erinnerung bleiben.

Olga Prokopets danke ich dafür, dass sie die beste Schreibtischnachbarin der Welt ist.

Katharina Elsässer danke ich für alles Mögliche, vor allem aber für ihren wundervollen Humor.

Allen Wahlpflichtstudenten und Bachelorstudenten danke ich für die gute Mitarbeit. Mein besonderer Dank gilt Isabell Kuhn und Tanja Grün, die mit viel Begeisterung, Fleiß und Talent bei der Sache waren.

Stefanie Gärtner, Anne Raßbach, Anne Bretz und Jessica Kuckwa, schön, dass wir uns beim Mentorinnen Netzwerk kennengelernt haben und so manche heitere Stunde beim Diskutieren über das Für und Wider der Wissenschaft verbracht haben.

Julia Dietrich, Kathrin Zindel, Maiko Ziegler, Sabrina Keil, Anja Gille, Catharina Schmitt und Hendrik Baumbach danke ich für ihre Freundschaft und die vielen kleinen und großen Begebenheiten, die wir miteinander erlebt haben.

Ich danke meiner Familie für alle Unterstützung.

Schließlich gilt mein allerherzlichster Dank meinem Mann David, dessen uneingeschränkte Unterstützung mir stets der größte Rückhalt ist.